

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**DETECCIÓN MÚLTIPLE DE LAS MUTACIONES KDR V410L,
V1016I Y F1534C EN POBLACIONES DE *Aedes aegypti* (L.)
RESISTENTES A INSECTICIDAS PIRETROIDES**

POR

Q.B.P. ESTEBAN DE JESÚS MORA JASSO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN ENTOMOLOGÍA MÉDICA Y VETERINARIA**

ENERO, 2020



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



TESIS

**DETECCIÓN MÚLTIPLE DE LAS MUTACIONES KDR V410L,
V1016I Y F1534C EN POBLACIONES DE *Aedes aegypti* (L.)
RESISTENTES A INSECTICIDAS PIRETROIDES**

POR

Q.B.P. ESTEBAN DE JESÚS MORA JASSO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN ENTOMOLOGÍA MÉDICA Y VETERINARIA**

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN, MÉXICO

ENERO, 2020

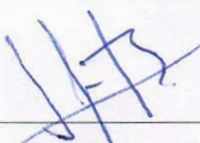
DETECCIÓN MÚLTIPLE DE LAS MUTACIONES *KDR* V410L, V106I Y F1534C EN
POBLACIONES DE *Aedes aegypti* (L.) RESISTENTES A INSECTICIDAS
PIRETROIDES.

Comité de tesis



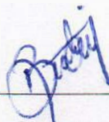
Dra. Adriana Elizabeth Flores Suárez

PRESIDENTE



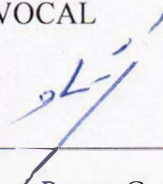
Dr. Ildefonso Fernández Salas

SECRETARIO



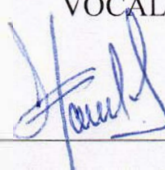
Dra. Beatriz López Monroy

VOCAL



Dr. Gustavo Ponce García

VOCAL



Dra. Susana Favela Lara

VOCAL

**DETECCIÓN MÚLTIPLE DE LAS MUTACIONES *KDR* V410L, V106I Y F1534C
EN POBLACIONES DE *Aedes aegypti* (L.) RESISTENTES A INSECTICIDAS
PIRETROIDES.**



Dra. Adriana Elizabeth Flores Suárez

DIRECTOR DE TESIS

Enero 2020

AGRADECIMIENTO
AL CONACYT PN-2016 NO. DE PROYECTO 2134, POR HABER OTORGADO UNA
BECA (NO. DE REGISTRO 28063) EN EL PERÍODO DE AGOSTO DE 2018 A JULIO
DEL 2019

Índice

Sección	Página
Resumen.....	5
1.Introduccion.....	6
2.Antecedentes.....	8
2.1. El vector.....	8
2.2. Control del mosquito.....	8
2.3. Piretroides, mecanismo de acción.....	9
2.4. Resistencia a insecticidas una amenaza para el control de <i>Ae. aegypti</i>	12
2.4.1. Resistencia <i>kdr</i>	13
2.4.2. Mutaciones en el gen <i>para</i> del <i>vgsc</i> en <i>Ae. aegypti</i>	15
3.Justificacion.....	20
4. Hipótesis	22
5. Objetivos.....	22
5.1. Objetivo general.....	22
5.2. Objetivos especificos.....	22
6. Material y Metodos.....	23
6.1. Material biológico.....	23
6.1.1. Origen de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i>	23
6.1.2. Colecta y manejo de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i>	24
6.1.3. Cepa de referencia.....	24
6.2. Análisis de las mutaciones <i>kdr</i> V410L, V1016I Y F1534C.....	24
6.2.1. Extracción de ADN.....	24
6.2.2. Reacción de PCR para oligonucleótidos específicos.....	25
6.3 Bioensayos.....	27
6.3.1. Insecticidas.....	27
6.3.2. Ensayos en botella (CDC 2010)	27
6.4 Diseño de PCR multiplex para V410L, V1016I y F1534C.....	28
6.5. Análisis de resultados.....	30
6.5.1. Análisis de frecuencia alélica y genotípicas V410L, V1016I y F1533C.....	30
6.5.2 Bioensayos.....	32
6.5.3. Asociación de fenotipo-genotipo.....	33
6.5.4. Validación del protocolo PCR multiplex.....	33
7. Resultados.....	34
7.1 Frecuencia de las mutaciones V410L, V106I, F1534C en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i>	34
7.2 Resistencia a piretroides.....	39
7.3 Asociación fenotipo-genotipo.....	41
7.4 Estandarización de la PCR Multiplex.....	47
7.5 Validación de la PCR Multiplex.....	53
8. Discusión.....	54

9. Conclusión1.....	59
10. Literatura citada.....	60

Índice de figuras y tablas

Número y nombre de la figura	Página
Figura 1: Tratamiento Focal y Perifocal.....	9
Figura 2: Distribución de iones a cada lado de la membrana celular de la neurona en potencial de reposo.....	12
Figura 3: Localización de los sitios de colecta de <i>Aedes aegypti</i> L.....	15
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% de productos amplificados de DNA en varios mosquitos usando la PCR múltiple.....	48
Figura 6. se muestran los geles de agarosa para cada una de las mutaciones de manera individual.....	50
Tabla 1: Secuencias de oligonucleótidos para la detección de las mutaciones V410L, V1016I Y F1534C.....	29
Tabla 2. : . Frecuencias alélicas y genotípicas de la mutación V410L en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> del este y sur de México.....	35
Tabla 3. Frecuencias alélicas y genotípicas de la mutación V1016I en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> del este y sur de México.....	36
Tabla 4. Frecuencias alélicas y genotípicas de la mutación F1534C en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> del este y sur de México.....	37
Tabla 5. Co-ocurrencia de genotipos para las mutaciones V410L, V1016I y F1534C en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> del este y sur de México.....	38
Tabla 6. Mortalidad de hembras de <i>Aedes aegypti</i> después de la exposición a dosis diagnóstico de insecticidas piretroides y estatus en el nivel de resistencia.....	39
Tabla 7. Número de individuos por categoría (vivo-muerto) y número de individuos por genotipo para el loci 410 de poblaciones de <i>Ae. aegypti</i>	42
Tabla 8. Número de individuos por categoría (vivo-muerto) y número de individuos por genotipo para el loci 1016 de poblaciones de <i>Ae. aegypti</i>	44
Tabla 9. Asociación de genotipo resistente para F1534C con la resistencia a piretroides...45	45
Tabla. 10. Combinación genotípica para los loci 410, 1016, 1534.....	52
Tabla 11. Frecuencias de las mutaciones L410, I1016, C1534 en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de México determinadas por la técnica de PCR Multiplex en contraste con AS-PCR.....	53

Resumen

Aedes aegypti L. es el principal vector de las arbovirosis en México llegando a transmitir dengue, Chikungunya, Zika y Fiebre amarilla. Los insecticidas químicos son de uso preferente para evitar la proliferación del mosquito, y por ende las enfermedades. A tal extremo se ha llevado el uso de este método que ha provocado la selección de mutaciones en el sitio blanco de acción que confieren resistencia a insecticidas, lo que complica aún más el control del vector. Mediante el uso de herramientas genéticas se ha detectado que esta resistencia al derribo (kdr) se debe a cambios puntuales dentro del gen *kdr* del canal de sodio dependiente de voltaje. Se analizó el genotipo individualmente para cada mosquito por AS-PCR con oligonucleótidos específicos para cada mutación kdr V410L, V1016I y F1534C en 25 poblaciones de *Ae. aegypti* (L). del este y sur de México, México, se incluyó una población de Belice. De las poblaciones genotipadas se seleccionaron diez las cuáles fueron sometidas a bioensayos con permetrina, deltametrina y transflutrina. Una vez que se comprobó la resistencia de las poblaciones de *Ae. aegypti*, dio bases para proseguir con el proceso de la detección múltiple de estas mutaciones. Se estandarizó una PCR multiplex para las tres mutaciones y se validó por comparación con los resultados previos del genotipado individual. Los resultados de genotipado individual mostraron altas frecuencias de las tres mutaciones kdr en las poblaciones seleccionadas con frecuencias de 0.12 a 0.98 para V1016I, 0.19 a 0.95 para V410L y con mayores frecuencias para F1534C, encontrándose fija en nueve de las 25 poblaciones. Las poblaciones resultaron resistentes a los tres piretroides. En caso de permetrina solo una de las diez poblaciones analizadas exhibió susceptibilidad, para la deltametrina dos poblaciones exhibieron susceptibilidad y el resto resistencia y para el caso de transflutrina, un piretroide de reciente introducción también se registró resistencia en el 80% de los casos. Los resultados de la validación mostraron un 100% de concordancia entre la PCR multiplex y la AS-PCR mostrando alta sensibilidad y especificidad. Nuestro método es el primero diseñado para el genotipado múltiple de las tres mutaciones kdr en *Ae. aegypti* en México, V410L, V1016I y F1534C. Con esta estrategia se podrán llevar a cabo en un análisis exhaustivo de la frecuencia de mutaciones kdr en las poblaciones del vector con una precisión adecuada y con una reducción en tiempo y costo considerable al análisis individual de cada mutación kdr.

Abstract

Aedes aegypti L. is the primary vector of arbovirosis in Mexico, transmitting dengue, chikungunya, Zika, and yellow fever. Chemical insecticides are used to prevent the proliferation of the mosquito, and therefore diseases. To date, the use of this method has caused the selection of mutations in the target site of pyrethroid insecticides that confer resistance to this kind of insecticides, affecting the control of the vector. The use of genetic tools has been useful to detect the knock-down resistance (kdr), which is due to specific changes in the para gene for the voltage-dependent sodium channel. Twenty-five *Aedes aegypti* (L.) populations from east and southern Mexico were genotyped by AS-PCR for each kdr mutation V410L, V1016I and F1534C, we included a population from Belize. Of the genotyped populations, ten were selected, which were subjected to bioassays with permethrin, deltamethrin, and transfluthrin. Once the resistance of *Ae. aegypti* populations were confirmed with proceeded to standardize to continue the method for the multiple detections of these mutations. A multiplex PCR was standardized for the three mutations and validated by comparison with the previous results of the individual genotyping. The individual genotyping results showed high frequencies of the three kdr mutations in the selected populations with frequencies of 0.12 to 0.98 for I1016, 0.19 to 0.95 for L410, and with higher frequencies for C1534, being fixed in nine of the 25 populations. The populations were resistant to the three pyrethroids, in the case of permethrin only one of the ten populations analyzed exhibited susceptibility, for deltamethrin two populations exhibited susceptibility and the rest resistance and for the case of transfluthrin, a newly introduced pyrethroid also showed resistance in 80% of the cases. The multiplex PCR showed high sensitivity and specificity in comparison to AS-PCR, with 100% concordance between these two techniques in genotyping the three kdr mutations. Our method is the first designed for multiple genotyping of the three kdr mutations in *Ae. aegypti* in Mexico, V410L, V1016I, and F1534C. With this strategy, it is possible to carry out an exhaustive analysis of the frequency of kdr mutations in the populations of the vector, with adequate precision and with a considerable reduction in time and cost in comparison to the individual analysis of each kdr mutation.

1. INTRODUCCIÓN

El mosquito *Aedes aegypti* L. es el principal vector de las arbovirosis dengue, Chikungunya, Zika y fiebre amarilla en diferentes partes del mundo (Smith 2016), por lo cual debido a su impacto como agente transmisor se han implementado diversos programas para su control, tales como el químico, biológico y cultural. Actualmente, se han desarrollado nuevas estrategias, como lo son el uso de mosquitos transgénicos e implementación de la técnica de macho estéril (Oliva et al. 2014). En México, históricamente dentro de los programas de control químico se han utilizado diversos grupos de insecticidas como lo son organoclorados, organofosforados y a partir de los años 90's insecticidas piretroides, principalmente permetrina, éste último relacionado a la selección de mutaciones asociadas al canal de sodio dependiente de voltaje (*vgsc*), llamadas mutaciones *kdr* por sus siglas en inglés “knock down resistance” o resistencia al derribo.

El gene que codifica para el canal de sodio en insectos se denomina *para* y fue identificado en *Drosophila* spp (Loughney et al. 1989). La secuencia de aminoácidos de las subunidades alfa codificados por el gen *para*, analizados en conjunto tiene una gran similitud. Cada uno de los genes consiste en cuatro dominios homólogos repetidos (I-IV) con seis segmentos transmembranales (S 1-6) en cada dominio. Los piretroides actúan modificando la activación de los canales de sodio alentando la activación e inactivación de dicho canal (Alonso-Díaz et al. 2006).

En el 2007 se reportó una mutación *kdr*, V1016I en *Ae. aegypti* (Saavedra et al. 2007) en México. Se demostró que esta mutación no estaba presente en 1990's, basado en datos preliminares de examen de ADN preservado de *Ae. aegypti* obtenido para otros fines (Ponce-García et al. 2009). En este estudio se demostró que la frecuencia de esta mutación se incrementó de 2-5% entre 2003-2006 a 38-80% entre el 2007 al 2009, para cinco estados de México: Nuevo León, en el norte, Veracruz, en la costa central del Atlántico, y Yucatán, Quintana Roo y Chiapas en el sur; coincidiendo con la aplicación continuada de una formulación con base en permetrina autorizada para el control de vectores en México. Posteriormente, Siller et al. (2011) reporta aumento de la frecuencia de esta mutación llegando

a fijarse en algunas poblaciones de *Ae. aegypti* de varias localidades de México. Para el 2013 una segunda mutación *kdr*, F1534C se reportó en poblaciones del mosquito en los estados de Guerrero y Yucatán (Aponte et al. 2013, Saavedra et al. 2013, 2015). En el 2015 Vera-Maloof y colaboradores en un estudio sobre la co-evolución de las mutaciones V1016I y F1534C en México realizaron un análisis sobre el desequilibrio de ligamento con las frecuencias de cuatro haplotipos en I1016 y C1534 en 51 poblaciones provenientes de México del 1999-2012. El análisis sugiere que para que se presente la resistencia a piretroides en el gen *para* del canal de sodio requiere una evolución secuencial de las dos mutaciones. Estos estudios sugieren que el conocimiento de las frecuencias en estas mutaciones es importante para predecir el potencial de evolución en *kdr*.

Recientemente se identificó una nueva mutación que sustituye leucina por valina en la posición 410 en el segmento seis del primer dominio del canal de sodio en poblaciones de Brasil y su efecto en el *vgsc* fue confirmado por electrofisiología (Haddi et al. 2017), posteriormente en un estudio retrospectivo esta misma mutación fue identificada en colecciones de mosquito colectadas en los años 2000 a 2012 en 6 localidades del Golfo de México, apareciendo por primera vez en 2002 y aumentado sus frecuencias en los últimos 16 años (Saavedra-Rodriguez et al. 2018).

El portafolio de insecticidas disponibles para el control de artrópodos vectores de patógenos es muy limitado y es poco probable que aumente en el futuro cercano, debido principalmente al alto costo del desarrollo de nuevas moléculas y productos. Por lo tanto, el surgimiento de la resistencia a los insecticidas de uso común es una grave amenaza a nuestra capacidad para combatir las enfermedades transmitidas por *Ae. aegypti*. Esto recalca la gran importancia de la supervisión de la resistencia a insecticidas en éstos a través del desarrollo e implementación de técnicas rápidas y precisas.

La investigación propuesta se basa en implementar una técnica de diagnóstico molecular para la determinación simultánea de las mutaciones *kdr* (V410L, V1016I y F1534C) que confieren resistencia a insecticidas piretroides en *Ae. aegypti* en México.

2. ANTECEDENTES

2.1 El vector

El mosquito *Ae. aegypti* es el principal vector de dengue, virus Chikungunya y Zika en México, aunque *Ae. albopictus* es un vector secundario en Asia, se encuentra distribuido en Norte América (incluyendo México) y Europa. Además de estas dos especies bien establecidas *Ae. polynesiensis* (en la Polinesia Francesa, Islas Cook y Wallis y Futuna) y *Ae. scutellaris* (en Nueva Guinea) han mostrado ser vectores eficientes (Rodhain y Rosen 1997). *Ae. hensilli* fue identificado como un vector en la Micronesia (Savage 1998) y *Ae. frucifer* y *Ae. luteocephalus* son reconocidos como probables vectores selváticos en el oeste de África.

2.2 Control del mosquito

Una de las posibles razones por las que ha sido tan difícil controlar *Ae. aegypti* es la falta de evaluación del impacto de las medidas de control. En general, el uso de la vigilancia entomológica en la evaluación del control de *A. aegypti* se ha visto limitada por la falta de indicadores entomológicos prácticos y confiables (Barrera 2016). De acuerdo con el CENAPRECE, Secretaría de Salud de México (NOM-032-SSA2-2014, 2015) se tienen distintos tipos de control de *Ae. aegypti* mediante insecticidas usando las siguientes estrategias:

- Tratamientos focales (Figura1.1)
- Tratamientos perifocales (Figura1.2)
- Tratamientos residuales
- Tratamiento por aspersiones aéreas



Figura 1. Tratamiento focal perifocal Laly Reategui (2017).

Para el control químico el control de mosquitos adultos (adulticidas) se realiza mediante diversos métodos los cuales son; rociados espaciales terrestres con nieblas frías de ultra bajo volumen (UBV) o térmicas aplicadas en espacios abiertos con equipos pesados. Rociados intradomiciliarios con neblinas térmicas, rociados espaciales aéreos con neblinas frías, rociado residual y adulticidas incorporados en mosquiteros de cama o cortinas. Mientras que para el control larvario se tienen diferentes tipos larvicidas que pueden ser: químicos convencionales productos microbianos y botánicos.

Los métodos químicos más comunes empleados como larvicida es el insecticida organofosforado temefos (granulado). Mientras que para adultos se utilizan los piretroides sintéticos permetrina, deltametrina, lambdaciolotrina, remestrina, sumitrina entre otros que han sido utilizados contra mosquitos o aplicados a superficies como mosquiteros, pabellones, cortinas y otros artículos para la protección personal (Zaim et al.2000, Kroeger et al. 2006). En México, la aplicación de piretroides como adulticidas, particularmente permetrina, está establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014, y el método más empleado para su aplicación en México es el conocido rociado espacial (nebulización). Otro método de prevención es el uso de repelentes que bloqueen la picadura y por lo tanto la transmisión de enfermedades de las cuales es vector *Ae. aegypti* (NOM-032-SSA2-2014, 2015).

2.3 Piretroides, mecanismo de acción

Los piretroides tienen su origen del piretro que es un insecticida de contacto obtenido de las flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Compositae). En 1945 se sintetizó el primer piretroide, la retrolona. Los piretroides son compuestos sintéticos derivados estructuralmente de la piretrina I (uno de los seis compuestos del piretro) y se encuentra entre los insecticidas

más potentes, son de amplio espectro y actúan principalmente por contacto, de modo que pueden usarse para controlar una gran variedad de insectos plaga en diferentes cultivos, en ganado y en campañas de salud pública. Actúan sobre las fases larvarias y adultas de lepidópteros, coleópteros, dípteros y homópteros. No son fitotóxicos en dosis correctas. Son adecuados para regiones de clima templado a frío, poseen un coeficiente térmico invertido (como el DDT): son mucho más efectivos a temperaturas bajas. Por la variedad de sus estructuras, los piretroides pueden variar considerablemente en sus propiedades (Albert et al. 1990).

Con base a los síntomas de su toxicidad, los piretroides se han clasificado en dos grupos: de Tipo I y de Tipo II (Albert et al. 1990). Los signos típicos de intoxicación por los piretroides del Tipo I incluyen hiperexcitabilidad y convulsiones, mientras que los piretroides del Tipo II causan principalmente ataxia y descoordinación.

Los piretroides para su clasificación han sido colocados en cuatro categorías o generaciones.

- La primera generación contiene solo un piretroide: la aletrina.
- La segunda generación incluye:
 - Tetrametina: fuerza de derribo mayor que la aletrina y fácilmente sinergizada. 1965
 - Resmetrina: 20 veces más efectiva que el piretro sin sinergistas. 1967
 - Bioresmetrina: 50 veces más efectiva que el piretro sin sinergistas. 1967
 - Fenotrina: intermedia en calidad y ligeramente incrementado por sinergistas. 1973
- La tercera generación incluye: fenvalerato y permetrina, aparecieron en 1972 y 1973, respectivamente. Primeros piretroides agrícolas debido a su actividad insecticida excepcional y su foto estabilidad.
- La cuarta generación aún sigue en desarrollo y registro. Ejemplos de insecticidas piretroides de cuarta generación son la cipermetrina, fenopropatrina, flucitrinato, fluvalinato y decametrina. Todos estos insecticidas son fotoestables y proveen efectividad residual en el campo (Bowman et al. 2004).

El modo de acción de los piretroides es interferir con las funciones del sistema nervioso y actúan sobre el axón en los sistemas central y periférico mediante la interacción con los canales de sodio y/o desplazando al ácido kainico de sus uniones específicas en los mamíferos y en los

insectos. A semejanza de las piretrinas, bloquean los impulsos nerviosos en el nivel de su transmisión final. Los efectos de estos compuestos pueden ser de cuatro tipos; el primero por sobreexcitación nerviosa sin contracciones musculares, se cree que esta etapa los efectos son sobre los nervios sensoriales, el segundo por afección de los nervios motores que, en consecuencia, presentan excitaciones sucesivas las que causan contracciones musculares, el tercero por contracciones musculares de larga duración (30 – 60 segundos) que se deben quizá a efectos directos de los piretroides sobre los músculos y por último el cuarto por obstrucción total de los impulsos nerviosos.

La muerte puede sobrevenir a causa de la combinación de dos o más de estos mecanismos o de la sucesión de los cuatro. Estudios sobre la interacción de los piretroides con las células nerviosas de los insectos han demostrado que al inicio estos compuestos estimulan cargas repetidas en dichas células y después las paralizan. La membrana de las células nerviosas (figura 6) es el sitio en donde los piretroides causan mayor efecto; en condiciones normales, la célula nerviosa restablece el equilibrio mediante procesos fisicoquímicos que regulan la relación sodio-potasio; sin embargo, se ha establecido que la presencia de piretroides bloquea la conductividad de estos cationes y provoca parálisis nerviosa en los insectos intoxicados (efecto de derribo o knockdown) (Maestre-Serrano et al. 2018)

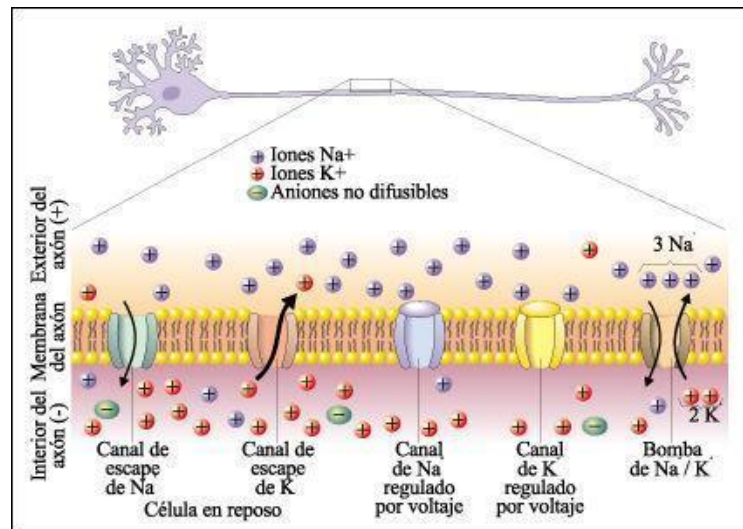


Figura 2. Distribución de iones a cada lado de la membrana celular de la neurona en potencial de reposo (Curtis, Barnes, Schneck & Flóres, 2003)

En insectos, los efectos de los piretroides, especialmente los del Tipo I, pueden desarrollarse en 1-2 minutos después del tratamiento y pueden resultar en la caída, es decir, en la pérdida de la postura normal y de la locomoción.

La intoxicación con piretroides resulta de sus potentes efectos sobre la generación de impulsos nerviosos tanto dentro del sistema nervioso central como del periférico. Los compuestos del Tipo I inducen picos múltiples de las descargas en los nervios sensoriales periféricos y de los nervios motores, lo mismo que las interneuronas dentro del sistema nervioso central. En contraste, los piretroides del Tipo II despolarizan el potencial de las membranas de los axones, lo cual reduce la amplitud del potencial de acción y eventualmente lleva a la pérdida de excitabilidad eléctrica. Todos estos efectos ocurren porque los piretroides prolongan la corriente que fluye por los canales de sodio al hacer más lento o impedir el cierre de los canales. La sinapsis neuromuscular de los insectos es un blanco especialmente importante para los piretroides (Blomquist, 2003).

2.4 Resistencia a insecticidas una amenaza para el control de *Ae. aegypti*.

La reducción de las poblaciones de vectores o la prevención del contacto vector-humano son los principales objetivos para el control de una enfermedad arboviral en la que se carece de una vacuna. Sin embargo, el portafolio de insecticidas disponible para el control de vectores es muy limitado (Hemingway et al. 2006). Esto a causa del uso excesivo de piretroides en años recientes tanto en aplicaciones espaciales como en superficies impregnadas.

Los mecanismos generalizados de resistencia a los insecticidas en artrópodos vectores son bien conocidos (Brogdon y McAllister 1988a, Hemingway et al. 2004, Hemingway y Ranson 2000). Gracias a su conocimiento y entendimiento se ha llegado a estandarizar una serie de bioensayos, ensayos bioquímicos y, más recientemente, genético/ moleculares para la detección y cuantificación de la resistencia a los insecticidas (Brogdon y McAllister 1988 a, b; Chadwik et al. 1977). El amplio uso de DDT para el control de *Ae. aegypti* en las Américas durante los años 1950 y 1960 trajo como consecuencia la aparición de resistencia (Brown y Pal 1971). Esto fue desafortunado porque tanto el DDT como los piretroides tienen como objetivo el canal de sodio dependiente de voltaje en el axón de la neurona en insectos. De hecho, debido al modo de acción similar entre estos insecticidas se ha registrado resistencia cruzada a los piretroides en poblaciones de *Ae. aegypti* resistentes a DDT (Brenques et al.

2003, Chadwik et al. 1977, McDonald y Wood 1979, Prasittisuk y Busvine 1977, Rongsriyam y Busvine. 1975).

2.4.1 Resistencia kdr

La investigación propuesta se centra en la resistencia knock down (kdr) o resistencia al derribo y se refiere al mecanismo de resistencia a piretroides y DDT, en el que los insectos no pierden inmediatamente coordinación debido a la reducción de la sensibilidad en el sistema nervioso de insecto después de la exposición al insecticida. Típicamente kdr no es afectado por sinergistas que inhiben esterasas y monooxigenasas, sino que surge a través de mutaciones no sinónimas en el gen trans-membranal del canal de sodio dependiente de voltaje que reduce la unión del piretroide al canal de sodio que pasa a través de la membrana de la célula nerviosa. Kdr normalmente limita la acción de los piretroides en diversos grados dependiendo de si el insecticida contiene un alcohol desciano-3-fenoxibenzilo (piretroide tipo 1) o un alcohol α -ciano-3-fenozibencilo (piretroide tipo 2). Por lo tanto, la detección de kdr en el campo tiene graves consecuencias para el uso sostenido de piretroides en el control de mosquitos vectores de enfermedades. Por lo que la detección temprana y la caracterización de kdr es fundamental para el desarrollo de estrategias para el manejo de la resistencia (Saavedra-Rodriguez et al. 2007).

El primer gen del canal de sodio de insectos (gen para, después nombrado como DmNav) fue clonado de *Drosophila melanogaster* basados en mutaciones (Loughney et al. 1989). La estructura general y la secuencia del aminoácido de la proteína del gen DmNav tienen una alta similitud con las subunidades- α de los canales de sodio de los mamíferos.

En los años 90's la resistencia a los piretroides fue genéticamente ligada a las secuencias del gen DmNav-para en moscas y cucarachas (Soderlund, 2005). Estos descubrimientos desencadenaron una serie de estudios que resultaron en el aislamiento parcial o total de cDNA de DmNav de muchas plagas y vectores de enfermedades humanas. Recientemente, la secuenciación genética proporciona secuencias de genes de la familia DmNav de los canales de sodio de distintas especies de insectos.

La asociación entre kdr y modificaciones en el sitio de acción fueron confirmados por estudios con neurotoxinas y mapeo genético por primera vez en *Musca domestica* L

(Bloomquist y Miller, 1986). Donde una sola mutación en el segmento transmembranal 6 de dominio II (DIIS6), localizado en el cromosoma 3, causaba sensibilidad reducida a insecticidas piretroides (Williamson et al. 1996).

Tras el descubrimiento hecho por Brengues et al. (2003) en donde muestra dos mutaciones en la región "super-kdr", Gly923Val y Leu982Trp en poblaciones de *Ae. aegypti* del sureste asiático. Se han descubierto dos mutaciones, Leu946Gln y Phe1538Cys, que se asocian comúnmente con resistencia a piretroides y DDT. Leu946Gln que se produce en la región "super-kdr", mientras que Phe1538Cys se produce abajo en la región P-loop. Ambas regiones se saben que contienen sustituciones que confieren resistencia a los piretroides (O'Reilly et al. 2006). Existen reportes de cinco sitios adicionales en la región "super-kdr" que se asocian comúnmente con la resistencia a los piretroides: Met918Val, Met918Thr, Leu925Ile, Thr929Ile y Leu932Phe (Soderlund y Bloomquist 1989, 1990 Soderlund y Knipple. 2003).

Rinkevich et al. (2013) hacen una revisión sobre la diversidad y convergencia de mutaciones kdr involucradas en la resistencia a piretroides en artrópodos. En dicho análisis reportan 30 mutaciones o combinaciones de mutaciones asociadas a resistencia y detectadas en más de una especie, así como, mutaciones que solo se han identificado en una sola especie de artrópodos. También mencionan que la mayoría de estas mutaciones reduce la sensibilidad a piretroides a los canales de sodio de mosca doméstica, cucaracha y *Drosophila*; por su parte Dong et al. (2014) mencionan que más de 50 mutaciones en el canal de sodio han sido identificadas como responsables o asociadas con la resistencia al derribo (kdr) causado por piretroides en varias especies de artrópodos plaga y vectores de enfermedades.

2.4.2 Mutaciones en el gen *para* del *vgsc* en *Ae. aegypti*

Para el caso de *Ae. aegypti* se han identificado once mutaciones en el gen *para* de *vgsc* y, en la mayoría de los casos, han sido vinculados por conferir un cierto grado de resistencia a piretroides. Entre estas están: G923V, L982W, I1011M y V1016G identificados por primera vez en el 2003; I1011V y V1016I en el 2007; D1763Y en el 2009; S989P y F1534C en el 2010; T1520I en el 2015 y V410L en el 2017. Estas mutaciones kdr generalmente se limitan a áreas geográficas específicas y la co-ocurrencia de ciertas mutaciones son un fenómeno común a veces asociado con niveles más altos de resistencia fenotípica. Hasta la fecha, solo se han

confirmado funcionalmente cinco mutaciones para reducir la sensibilidad del *vgsc* a los piretroides, entre ellas S989P (IIL5-6), I1011M, V1,016 G (IIS6), F1534C (IIS6) y más recientemente V410L (IS6) (Saavedra et al. 2018).

En México, poblaciones resistentes de *Ae. aegypti* portan al menos dos mutaciones V1016I que está vinculada a la supervivencia a la permetrina y F1534C que reduce la unión de permetrina a los canales de *vgsc*.

La primera mutación reportada fue V1016I en colecciones de *Ae. aegypti* de Isla Mujeres, Quintana Roo, México. Esta mutación se produce a través de una transición G \leftrightarrow A en la primera posición del codón 1016 causando una sustitución de valina por isoleucina. Experimentos de selección posteriores, uno con deltametrina en una cepa de campo de Santiago de Cuba y otro con permetrina en una cepa de Isla Mujeres en México, demostraron un rápido incremento en la frecuencia del alelo I1016. Bioensayos posteriores de la descendencia F₃ obtenida de la cruce entre una población susceptible a permetrina (genotipo V1016/V1016) con una resistente al piretroide (genotipo I1016/I1016) mostró que el alelo I1016 se segregaba como alelo recesivo para la resistencia *kdr*. También se demostró que la frecuencia de homocigotos I1016 predice acertadamente el porcentaje de derribo de adultos de *Ae. aegypti* tras la exposición a la permetrina en bioensayos estándares con adulticidas usando la técnica de botella del CDC de Atlanta GA, USA. Lo anterior sugiere entonces que la mutación V1016I puede ser un biomarcador útil en esquemas de monitoreo de la resistencia dentro de un programa de manejo integrado de la resistencia a insecticidas en *Ae. aegypti*. Así también se encontraron otras tres mutaciones, V1016G, I1011M, I1011V en el gen *para* en *Ae. aegypti* en México (Saavedra-Rodríguez et al. 2007). Posteriormente en un estudio retrospectivo se determinó que la mutación V1016I no estaba presente en 1990's, basado en el análisis de ADN preservado de *Ae. aegypti* desde el 1990 (Ponce-Garcia et al. 2009). Sin embargo dentro del mismo análisis se demostró que la frecuencia de esta mutación se incrementó de 2-5% entre 2003-2006 a 38-80% entre el 2007 al 2009, para cinco estados de México: Nuevo León, Veracruz, Yucatán, Quintana Roo y Chiapas; coincidiendo con la aplicación continuada de una formulación con base en permetrina autorizada para el control de vectores en México. Posteriormente se demostró un aumento en la frecuencia de esta mutación en poblaciones de *Ae. aegypti* de cuatro estados de la república entre el 2007 y 2009

(Siller et al. 2011) . En el estado de Veracruz para el año 2009 la frecuencia global fue de 58% con una variación entre 0.19-0.83 en 7 ciudades. Las colecciones del estado de Nuevo León tuvieron una frecuencia global de 58% con variación entre 0.10-0.90. En el estado de Guerrero, el alelo I1016 casi llega a fijarse con una frecuencia de hasta el 0.97.

En el 2011 en la búsqueda de nuevas mutaciones confiriendo resistencia kdr en *Ae. aegypti* de Yucatán se encontró la mutación F1534C. Esta mutación había sido previamente reportada en poblaciones de *Ae. aegypti* de Islas Caiman y Singapore y en México en colecciones del estado de Guerrero obtenidas durante el 2009-2010 (Aponte et al. 2013). En un análisis retrospectivo se determinó la frecuencia del alelo mutado (C1534) en poblaciones de *Ae. aegypti* de Mérida. Temporalmente, la frecuencia del alelo incrementó concomitantemente con el alelo I1016.

Vera-Maloof et al. (2015) en un estudio sobre la co-evolución de las mutaciones V1016I y F1534C en México realizaron un análisis sobre el desequilibrio de ligamento con las frecuencias de cuatro haplotipos en I1016 y C1534 en 51 poblaciones provenientes de México, recolectadas previamente durante 1999-2012. El análisis sugiere que para que se presente la resistencia a piretroides en el gen *para* del canal de sodio requiere una evolución secuencial de las dos mutaciones. Los resultados que se obtuvieron en las poblaciones con el haplotipo I1016/F1534 se consideró que tienen un bajo “fitness”, mientras que las poblaciones susceptibles con el haplotipo V1016/C1534 en frecuencia alta son las que tienen un alto riesgo de evolución en kdr. El haplotipo resistente I1016/C1534 se incrementó en todas las colecciones. Finalmente, El haplotipo susceptible V/F1534 paso de la fijación a la extinción. Estos estudios sugieren que el conocimiento de las frecuencias en estas mutaciones es importante para predecir el potencial de evolución en kdr.

Recientemente fue identificada una nueva mutación kdr V410L en el segmento seis del dominio I del canal de sodio en una cepa de mosquitos resistentes a piretroides en Brasil (Haddi, 2017). En este estudio se determinó que esta mutación reduce la susceptibilidad a piretroides tipo 1 (permetrina) y tipo 2 (deltametrina) en canales de sodio de mosquito expresados en oocytes de *Xenopus*, sin embargo, esta mutación no fue identificada en colecciones de campo provenientes de Pernambuco Brasil (Haddi, 2017).

Por otra parte, este año la misma mutación V410L fue identificada en México en colecciones de 2002 a 2016 de *Aedes aegypti* (Saavedra-Rodríguez, 2018). Interesantemente

por medio de un estudio de asociación de genoma completo (GWAS) en mosquitos resistentes a piretroides, se identificó una alta frecuencia de V410L en colecciones previamente genotipadas con I1016 y C1534. Al parecer, L410 esta mayormente relacionada con I1016 que con C1534, sin embargo, en los estudios de fenotipo y genotipo, los individuos con resistencia por triple homocigoto tienen mejor aptitud en presencia de piretroides, es decir, mayor posibilidad de sobrevivencia ya sea por resistencia “knockdown” o por capacidad de recuperación. Si bien aún no se sabe exactamente porque V410L disminuye la sensibilidad del canal de sodio a la permetrina y deltametrina, debido a que a pesar de localizarse en DIS6 no forma parte del sitio del receptor PyR2, por lo que se cree que tiene relación con cambios en las propiedades de la puerta del canal sin inhibir el acoplamiento de la molécula (Saavedra-Rodríguez, 2018).

Chen et al. (2019) demostraron que la mutación V1016I siempre se encuentra coexistiendo con la F1534C en diferentes haplotipos, por lo que se tiene la sospecha que V1016I así como T1520I solo potencian la mutación F1534C, ya que estas mutaciones se analizaron en oocitos de *Xenopus* y se demostró no alteran la sensibilidad a permetrina y deltametrina per se, mientras que la combinación 1520+1534 era resistente a permetrina pero sensible a deltametrina, mientras que la combinación I1016+1534 era resistente a deltametrina y mucho más resistente a permetrina que la 1534 en solitario

2.4.3. Diagnóstico de mutaciones kdr en mosquitos

Se puede realizar la detección de alelos kdr en mosquitos por varios métodos La secuenciación de nucleótidos se considera el método más preciso como estándar de oro, pero este método es costoso y no es adecuado para examinar una gran cantidad de mosquitos.

Se han desarrollado varias técnicas basadas en PCR para detectar alelos kdr. Una de las técnicas validadas para este fin es la técnica desarrollada por AS-PCR punto final desarrollada Martinez-Torres et al. (1998) dando buenos resultados para el genotipado individual de las mutaciones L1011F y L1011S en *Anopheles gambiae*. Por otra parte, Saavedra et al. (2007) desarrolló un ensayo óptimo AS-PCR tiempo real con curva de disociación para la detección y el monitoreo de las frecuencias de I1011M, I1011V, V1016I y V1016G en poblaciones de *Ae. aegypti* de Latinoamérica. Aunque los productos amplificados también se pudieron detectar mediante electroforesis en gel de agarosa.

Rajatileka et al. (2008) desarrollaron una técnica alternativa que utiliza el ensayo HOLA para la detección de las mutaciones I1011M, V1011I, V1016I y V1016G en poblaciones de *Ae. aegypti* de Tailandia. Harris et al. (2010) analizaron la sensibilidad de este ensayo para la detección de la mutación V1016I en poblaciones de *Ae. aegypti* de Gran Caimán y Aponte et al. 2013 en población de México. Aunque este ensayo no implica el uso de radioisótopos o cualquier equipo especializado, requiere reactivos adicionales que pueden contribuir a un aumento de los costos.

Saingasmook et al. (2017) desarrollaron un ensayo de PCR multiplex punto final con revelación por electroforesis en gel de agarosa para la detección simultánea de V1016G y F1534C en *Ae. aegypti*. Este ensayo combina dos juegos de primers, el primero diseñado para la detección de V1016G (Saavedra-Rodríguez *et al.* 2007) y el segundo diseñado para detectar F1534C, el cual consta de 4 primers, dos de ellos amplifican una banda control de 368 pb y los otros dos son específicos para los alelos F1534 y C1534 generando productos amplificados de 232 pb y 180 pb respectivamente.

3. JUSTIFICACIÓN

Desde los primeros estudios realizados en México se demostró una relación lineal positiva entre la frecuencia de los individuos homocigotos mutados particularmente para la mutación V1016I y el porcentaje de derribo o “knock-down” en mosquitos adultos expuestos a la permetrina en bioensayos directos con el insecticida. Esto sugiere que el aumento de la mutación V1016I puede: 1) tener un impacto negativo en el control operativo de los adultos a través de la aplicación espacial de insecticidas piretroides, y 2) reducir la eficacia de los materiales impregnados con piretroides, los cuales han ganado popularidad en los últimos años como estrategia en el manejo de enfermedades transmitidas por vectores. Actualmente, el Programa Nacional de Control de Vectores de México en el 2014 implementó el monitoreo de la susceptibilidad/resistencia a insecticidas de una manera muy básica con el uso de dosis/tiempo diagnóstico a través del método de botellas impregnadas del CDC de Atlanta. A través de esta técnica solo se establece el cambio en la susceptibilidad en las poblaciones, sin embargo, no proporciona información sobre los mecanismos que confieren resistencia y la frecuencia en que se presentan en las poblaciones analizadas; siendo poco informativos para la toma de decisiones en un programa formal de manejo de la resistencia a insecticidas.

Para llevar a cabo un análisis exhaustivo de las mutaciones en la región para del canal de sodio dependiente del voltaje, que tienen el potencial de estar asociadas con la resistencia a los piretroides se han estandarizado los ensayos de PCR tiempo real con la curva de calibración, los cuáles han demostrado ser precisos y confiables; sin embargo, una de las principales limitantes es que el costo para la determinación del genotipo de una sola mutación kdr, en un solo mosquito actualmente en nuestro país es de ~ \$3.50 dólares, solo considerando los insumos (sin considerar equipo y personal capacitado). Por lo que es prácticamente prohibitivo realizar un análisis exhaustivo espacial y temporal de mutaciones kdr en el mosquito *Ae. aegypti*. Esto sería una tarea sencilla dada la tecnología actual, pero el desafío adicional es proporcionar una plataforma que puede ser utilizada por países como el nuestro con recursos limitados.

La implementación de una PCR multiplex punto final para la detección simultánea las mutaciones V410L, V1016I y F1534C ampliamente distribuidas en poblaciones de *Ae. aegypti*

en México, permitirá reducir los costos y tiempo de análisis para este mecanismo de resistencia en particular en comparación con el análisis por qPCR de oligonucleótidos específicos para cada mutación kdr en mosquitos individuales.

4. HIPÓTESIS

El protocolo estandarizado de PCR multiplex es sensible y específico para la detección simultáneamente de las mutaciones V410L, V1016I y F1534C en los individuos de las poblaciones de *Aedes aegypti* (L.) resistentes a piretroides.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar de manera simultánea en una sola reacción la presencia de mutaciones kdr (V410L, V1016I y F1534C) asociadas a los dominios I, II y III del *vsgc* de mosquitos adultos de *Ae. aegypti* provenientes de poblaciones resistentes a permetrina, deltametrina y transflutrina.

5.2 Objetivos Específicos:

- Estandarizar el protocolo de PCR multiplex para la detección simultánea de las mutaciones V410L, V1016I y F1534C en poblaciones de *Aedes aegypti* resistentes a piretroides.
- Validar el protocolo para la detección simultanea de las mutaciones V410L, V1016I y F1534C en las poblaciones de *Ae. aegypti* resistentes a insecticidas piretroides y previamente genotipadas individualmente para cada mutación kdr por AS-PCR.

MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material Biológico

6.1.1. Origen de las poblaciones de *Ae. aegypti*

Se recolectaron mosquitos *Ae. aegypti* de 26 localidades de diferentes estados de la República Mexicana, del estado de Nuevo León con dos sitios; Monterrey y Guadalupe. Quintana Roo con tres puntos: Chetumal, Felipe Carrillo y Cancún, Yucatán con cuatro ciudades: Valladolid, Kanasín, Umán y Mérida, de esta última se colectará de diferentes colonias; Vergel y San Antonio Kaua y Centro de Mérida. Veracruz con nueve puntos; Córdoba, Coatzacoalcos, Minatitlán, Cosoleacaque, Acayucan, Cardel, Emilio Carranza y Poza Rica. Campeche con 3 puntos; Campeche, Champotón y Ciudad del Carmen. Tabasco con 3 puntos; Heroica Cárdenas, Villahermosa y Frontera y el estado de Tamaulipas con un punto; Tampico.



Figura 3. Localización de los sitios de colecta de *Aedes aegypti* (L).

Así mismo se utilizó una cepa susceptible de *Aedes aegypti* (cepa de referencia) New Orleans.

6.1.2. Colecta y manejo de las poblaciones de *Ae. aegypti*

Para tales fines se realizaron colectas de inmaduros, mediante la búsqueda dirigida de estados inmaduros del mosquito en los lugares de cría natural. El material colectado se depositó en bolsas whirl-pak y transportados al insectario del laboratorio de Entomología Médica de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Larvas y pupas recolectadas fueron colocadas en charolas plásticas de 1.5 Lt de capacidad con agua dechlorada y una temperatura promedio de 30 °C. Las larvas se alimentaron con una solución de hígado de bovino en polvo (Liver powder MP Biomedicals, LLC) al 50% diluido en agua, al llegar a la etapa de pupa estas se colocaron en recipientes plásticos con agua dentro de jaulas entomológicas para la emergencia de los adultos los cuales se mantuvieron con solución azucarada al 10% y alimentación sanguínea para la obtención de huevos F0. Las condiciones de cría y mantenimiento fueron $25 \pm 2^\circ \text{C}$ de temperatura y un fotoperiodo 14: 10.

6.1.3. Cepa de referencia

El laboratorio cuenta con una cepa de referencia, cepa susceptible New Orleans donada el CDC de Atlanta y mantenida en condiciones de insectario por 18 años sin contacto con insecticidas o cualquier otro xenobiótico, la cual se empleó como (control) en los bioensayos.

6.2 Análisis de mutaciones kdr V410L, V1016I y F1534C, PCR nucleótido específica

6.2.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de los mosquitos, se utilizó la técnica de Coen et al. (1982) donde las muestras se maceraron de manera individual en 50µL de Grinding buffer (0.1M NaCl, 0.2M sucrosa. 0.1M Tris-HCl pH 9.1, 0.05M EDTA y 0.5% dodecilsulfato de sodio) con el uso de pistilos Kontes y en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Posterior a esto, se les añadió 50µL más de buffer, para tener un volumen final de 100µL. Los tubos se sometieron a una centrifugación de 13,000 rpm por 5 minutos. Se incubaron a 65°C durante 30 minutos, después se le administro 15µL de acetato de potasio (concentración de 8M) a cada tubo y se utilizó un vortex para homogenizar todos los contenidos. Se congelaron las muestras a -20°C por 40 minutos, y se centrifugo a 13,000 rpm por 15 minutos. Para separar el material genético de los reactivos y las proteínas, se separaron 80µL del sobrenadante de cada tubo y esto se transfirió

a tubos nuevos. Posteriormente, se realizaron lavados del DNA con diferentes concentraciones de etanol (70% y 100%) al igual con centrifugaciones para precipitar los ácidos nucleicos y luego formar las pastillas, las cuales se resuspendieron en 30µL de agua grado molecular (miliQ) posterior al vaciado de etanol y un secado con plancha de baño seco a 65°C por 1 a 3 minutos. Las muestras de DNA se almacenaron en congelación (-20°C) hasta requerirse para PCR múltiplex.

La calidad y pureza del DNA se determinó espectrométricamente usando un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA).

6.2.2. Reacción de PCR para oligonucleótidos específicos

Se llevaron a cabo análisis por AS-PCR para identificar las la presencia y frecuencia de las tres mutaciones V410L, V1016I y F1534C que confieren resistencia *kdr* según lo descrito por Saavedra-Rodríguez et al. (2007, 2018) y Yanola et al. (2011).

Para V410L, utilizó la técnica PCR alelo específica punto final para detección de la mutación V410L presente en el exón IS6 del gen *vgsc* de acuerdo a lo descrito por Villanueva-Segura (2019). En un tubo de 1.5ml se preparó un master mix, cuyo contenido por reacción fue: 12.50 µl de GoTaq (Promega, Madison, WI, USA), seguido de 11.35 µl de H₂O libre de nucleasas (NFW, Promega, Madison, WI, USA), posteriormente se añadió 1µM de cada uno de los cebadores (V410fw, L410fw y 410rev) (tabla 1). Después se colocaron 24µl del master mix en tubos con tapón de 0.5 ml seguido de 1 µl de ADN genómico de mosquito (~25 ng). Los tubos se llevaron a la centrifuga por 1 minuto, luego se colocaron en el termociclador Biorad T100 (Biorad, Hercules, CA, USA) con el siguiente programa de temperaturas: 3 minutos a 95°C, 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 20 segundos a 56°C y 20 segundos a 72°C, seguido de 5 minutos a 72°C. Para la detección por electroforesis en gel de agarosa, se utilizó un gel al 2.5% de agarosa preparado con buffer 1× Tris-Borate-EDTA (pH 8). Los productos amplificados fueron fraccionados mediante electroforesis por 80 minutos a 110 V junto a un marcador de 25pb (Bioline, London, UK).

Para la mutación V1016I, se preparó un Master mix con GoTaq® Colorless Master Mix, DNA polimerasa, agua bidestilada ultrapura en tubos Eppendprf de 1.5 ml de capacidad y los primer alelo específicos para amplificar la mutación la región IIS6 V1016I (tabla 1).

Se mezcló por pipeteo el master mix y se colocaron 14 µl en cada pozo de la placa de PCR, se añadió de 1 µl de ADN templado y se colocaron en el termociclador de punto final Biorad T100 (Biorad, Hercules, CA, USA). Las condiciones de la reacción serán: 95 °C por 3 min, 40 ciclos de 95 °C por 10 seg, 60 °C por 10 seg, 72 °C por 30 seg, 39 veces el paso 2, 72 °C por 5 minutos, finalmente 12 ° C por 5 minutos. Para la detección por electroforesis en gel de agarosa, se utilizó un gel al 3% de agarosa preparado con buffer 1× Tris-Borate-EDTA (pH 8). Los productos amplificados fueron fraccionados mediante electroforesis por 80 minutos a 110 V junto a un marcador de 25pb (Bioline, London, UK).

Para F1534C se preparó un master mix con GoTaq® Colorless Master Mix, DNA polimerasa, agua bidestilada ultrapura en tubos Eppendprf de 1.5 ml de capacidad y los primer alelo específicos para amplificar la mutación en la región IIS6 F1534C (tabla 1). Se mezcló por pipeteo el master mix y se colocó 14 µl en cada pozo de la placa de PCR, se añadió de 1 µl de ADN templado, finalmente se colocaron en el termociclador de punto final Biorad T100 (Biorad, Hercules, CA, USA). Las condiciones de la reacción fueron: 95° C por 4 min, 95° C por 1 min, 57° C por 1 min, 72 °C por 1min, 35 veces al paso 2, 72° C por 4 min y finalmente a 12 ° C. Para la detección por electroforesis en gel de agarosa, se utilizó un gel al 4% de agarosa preparado con buffer 1× Tris-Borate-EDTA (pH 8). Los productos amplificados fueron fraccionados mediante electroforesis por 80 minutos a 110 V junto a un marcador de 25pb (Bioline, London, UK).

Los productos amplificados se visualizaron bajo luz ultravioleta (UV) y se fotografiaron en un transiluminador (UVITEC, Cambridge, UK).

6.3 Bioensayos

A la par del análisis de la frecuencia de las mutaciones en las poblaciones de *Ae. aegypti* muestreados se seleccionaron 10 poblaciones para confirmar la resistencia a tres insecticidas piretroides. Para esta prueba se utilizó el método de botella del CDC (2010). Consiste en exponer un total de 100 mosquitos hembras de cada localidad a una concentración ya establecida por la (OMS 2016) para cada insecticida individualmente en el caso de permetrina

y deltametrina; para el insecticida transflutrina se utilizarán la concentración proporcionada por la empresa Bayer®.

6.3.1. Insecticidas

Deltametrina calidad reactivo ((*S*)- α -ciano-3-fenoxibencil (*1R*, *3R*)-3-(2, 2-dibromovinil)-2, 2- dimetilciclopropanecarboxilato) al 95.5% de pureza (Chemservice, West Chester, PA).

Transflutrina calidad reactivo ((*1R,3S*)-3-(2,2-Diclorovinil)-2,2-etano-1-ácido ciclopropanocarboxílico (2,3,5,6-tetrafluorofenilo)éster metílico) al 95.5% de pureza (Chemservice, West Chester, PA).

Permetrina calidad reactivo (3-Phenoxybenzyl (*1RS*)-cis,trans-3-(2,2-dichlorovinyl) - 2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate) al 99.60 de pureza (Chemservice, West Chester, PA).

Deltametrina, Permetrina y Transflutrina se usaron con la técnica de botellas impregnadas (Brogdon y McAllister 1998, CDC 2010).

6.3.2. Ensayos en botellas (CDC 2010)

Se utilizaron botellas Wheaton de 250ml., pipetas de vidrio de 1ml, Acetona, cada uno de los insecticidas, aspirador y mosquitos *Ae. aegypti* (L).

Las botellas se impregnaron adicionando el volumen necesario del insecticida y 1 ml de acetona para obtener la concentración deseada en cada botella ($\mu\text{g}/\text{botella}$), se taparon y se rotaron en varias direcciones con la finalidad de recubrir toda la superficie de la botella incluyendo la tapa, posteriormente se retiró la tapa y se colocó en una rotadora de botellas (WHEATON Bench Top Roller) durante algunos segundos para la evaporación del solvente, finalmente se resguardaron en una gaveta toda la noche protegidas de la luz.

Se realizaron bioensayos con la DD de transflutrina de 0.25 $\mu\text{g}/\text{botella}$, deltametrina 10 $\mu\text{g}/\text{botella}$ y permetrina a 15 $\mu\text{g}/\text{botella}$. Cada bioensayo consistió de cuatro repeticiones, más una como control, tratada solo con acetona. En cada botella se colocaron 25 mosquitos hembra sin alimentación sanguínea de 1-3 días de edad durante una hora, tiempo durante el cual se

observaron cada 10 minutos para registrar a los mosquitos caídos o derribados. El criterio para determinar el estado de derribe se basó en: 1) el mosquito se encuentre con el dorso en el fondo de la botella, 2) sea incapaz de volar, 3) tenga movimientos aberrantes y sea incapaz de mantenerse erguido. Posteriormente los mosquitos se transfirieron a vasos de recuperación con acceso a solución azucarada al 10% y se mantuvieron en condiciones de laboratorio hasta las 24 horas post exposición para el registro de la mortalidad.

6.4 Diseño de PCR multiplex para V410L, V1016I y F1534C

Una vez confirmada la resistencia a piretroides en las poblaciones de *Ae. aegypti* seleccionadas y habiendo realizado en genotipado individual de las mismas, a la par se llevó a cabo el diseño del protocolo estandarizado de PCR múltiples. Se tomó como referencia el proceso estipulado por Saingamsook et al., (2017) para las mutaciones V1016L y F1543C y se utilizan. Para tal efecto se utilizaron los primers de la tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de los primers usados en este estudio.

Primer	5'-3' Secuencia	Referencia
1534		Saingamsook et al 2017
Genotipo		
c1534-f	GCGTACCTGTGTCTGTTCCA	
c1534-r	GGCTTCTTCGAGCCCATCTT	
Ae1534F-r	GCGTGAAGAACGACCCGA	
Ae1534F-f	CCTCTACTTTGTGTTCTTCATCATCTG	
1016		Saavedra et al 2007
Genotipo		
V1016f*	[LongGCTail]ACAAATTGTTTCCCACCCGCACCGG	

I1016f** [ShortGCTail]ACAAATTGTTTCCCACCCGCACTGA

I1016r TGATGAACCSGAATTGGACAAAAGC

410

Saavedra et
al 2018

Genotipo

V410fw [LongGCTail]ATCTTCTTGGGTTCGTTCTACCGTG

L410fw [ShortGCTail]ATCTTCTTGGGTTCGTTCTACCATT

410 rev TTCTTCCTCGGCGGCCTCTT

*Long Tail 26b GCGGGCAGGGCGGCGGGGGCGGGGCC; **Short tail 6b GCGGGC

6.5 Análisis de resultados

6.5.1 Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas (V410L, V1016I y F1534C)

Se confirmaron los resultados de la genotipificación de las muestras de *Ae. aegypti* con el uso de cámaras de electroforesis y geles de agarosa al 2.5, 3 y 4% para las mutaciones V410L, V1016I y F1534C, respectivamente. Se emplearon 5µL de cada amplificación (incluyendo aquellas de los controles negativos y positivos) con 3µL de azul de bromofenol con GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) en cada pozo del gel, y en uno se colocaron 3µL de marcador molecular HyperLadder™ 25bp (Bioline). Los resultados se apreciaron con un fotodocumentador (UVITEC, Cambridge, UK).

El cálculo de frecuencias genotípicas y alélicas fueron realizados según el principio de Hardy-Weinberg (también conocido por una variedad de nombres: el equilibrio de Hardy-Weinberg, el teorema de Hardy-Weinberg, HWE, o ley de Hardy-Weinberg) el cual establece que tanto el alelo y genotipo de frecuencias en una población se mantienen constantes, es decir, que se encuentran en equilibrio, de generación en generación a menos específica influencias perturbadoras se introducen (Edwards, 1977).

Debido a que en esta investigación se analizaron dos alelos (en cada mutación), la fórmula utilizada en el PHW es las siguientes:

$$p + q = 1$$

En donde p representa la frecuencia del alelo dominante, en el caso de la presente investigación es representado por V410, V1016 o F1534, según el caso, q muestra la frecuencia del alelo recesivo el cual es representado con la letra L410, I1016 o C1534, la suma de estas frecuencias debe ser uno, esto debido a que las frecuencias son proporciones en la población o cepa estudiada.

Las proporciones de Hardy-Weiberg en las frecuencias genotípicas son representadas con la siguiente fórmula:

$$p^2 + q^2 + 2pq = 1$$

que también se puede representar en este estudio como $S^2 + R^2 + 2SR = 1$

S representa al susceptible y R al resistente. El cálculo de las frecuencias (f) genotípicas observadas se realizó dividiendo el número de mosquito con el genotipo a calcular entre el total de mosquitos analizados.

1. $f_{SS} = N^{\circ} \text{ de } SS / n$ frecuencia del genotipo homocigoto susceptible
2. $f_{SR} = N^{\circ} \text{ de } SR / n$ frecuencia del genotipo heterocigoto
3. $f_{RR} = N^{\circ} \text{ de } RR / n$ frecuencia del genotipo homocigoto resistente

Las frecuencias alélicas se calcularon sumando la frecuencia genotípica de los heterocigotos entre dos más la frecuencia de los homocigotos:

1. $p = f_{SS} + (f_{SR}/2)$ Frecuencia alélica de susceptible (S)
2. $q = f_{RR} + (f_{SR}/2)$ Frecuencia alélica de resistente (R)

Equilibrio de Hardy- Weinberg utilizando la prueba de χ^2 .

La comprobación del desequilibrio del PHW se suele llevar a cabo utilizando la prueba χ^2 de Pearson, utilizando las frecuencias genotípicas observadas que se han obtenido de los datos y las frecuencias genotípicas esperadas obtenidas mediante el PHW. Para esto se necesitó

calcular los genotipos esperados basándose en la frecuencias alélicas calculadas (p y q) con la siguiente fórmula (Hedrick, 2005):

$$\begin{aligned}SS\ esp &= S^2\ (n) \\RR\ esp &= R^2\ (n) \\SR\ esp &= 2SR\ (n)\end{aligned}$$

Después del cálculo de los genotipos esperados se calculó el equilibrio de Hardy – Weinberg siguiendo la fórmula de X^2 , la cual probó la hipótesis nula que establece que en la cepa estudiada se encuentra en equilibrio genético. El nivel de significancia es de 3.84, 1 grado de libertad, Probabilidad de 0.96.

Intervalo de Confianza Agresti-Coull (998).

Para corregir el tamaño de muestra se usó la siguiente fórmula:

$$\tilde{n} = n + 4$$

donde \tilde{n} es el tamaño de muestra corregido. Para corregir la frecuencia alélica (\tilde{p}) se utilizó la siguiente fórmula:

$$\tilde{p} = \frac{X + 2}{\tilde{n}}$$

Ya corregido se procedió a calcular el intervalo de confianza utilizando el tamaño de muestra y la frecuencia alélica corregida:

$$\tilde{p} \pm z_{1-\alpha/2} \sqrt{\frac{\tilde{p}(1-\tilde{p})}{\tilde{n}}}$$

6.5.2 Bioensayos

Los resultados de la prueba de los bioensayos se interpretaron de acuerdo a los criterios de la OMS (2016):

- Si la mortalidad está entre 98-100%: se considera que la población bajo estudio es susceptible al insecticida
- Si la mortalidad es menor al 98%: se sugiere resistencia. Se necesitan más pruebas para verificar.
- Si la mortalidad está entre 90% -97% (corregida si es necesario): indicativo de presencia de genes de resistencia en el vector y se deberá hacer la confirmación de la resistencia; se puede obtener realizando pruebas adicionales de bioensayo con el mismo insecticida en la misma población o en la progenie de cualesquier mosquitos supervivientes (criados en condiciones de insectario) y / o realizando ensayos moleculares para mecanismos de resistencia conocidos. Si al menos dos pruebas adicionales muestran consistentemente una mortalidad inferior al 98%, entonces la resistencia se confirma.
- Si la mortalidad es menor al 90%: confirmación de la existencia de genes resistentes en la población de prueba. Es posible que no se necesiten bioensayos adicionales, siempre que se haya probado un mínimo de 100 mosquitos.

6.5.3 Asociación de fenotipo-genotipo

Se generó una base de datos utilizando las mediciones realizadas, clase de fenotipo (pruebas de botella) y genotipo (frecuencia de genotipo resistente para cada mutación). Se llevó a cabo un análisis de asociación fenotipo-genotipo por medio de la razón de momios (OR) y se calculó la significancia estadística con la prueba de probabilidad exacta de Fisher ($P \leq 0.05$).

$$\text{Prob. de mosquitos vivos o muertos} = \frac{\text{No. de mosquitos mutados}}{\text{No. de mosquitos no mutados}}$$

$$OR = \frac{\text{Probabilidad de mosquitos vivos}}{\text{Probabilidad de mosquitos muertos}}$$

6.5.4 Validación del protocolo PCR Multiplex

Se comprobó la especificidad y sensibilidad del protocolo de PCR múltiple con respecto a los resultados obtenidos en las pruebas de genotipado individual por oligonucleótidos específicos para cada mutación con respecto a los de la amplificación por PCR multiplex para todas las poblaciones de *Ae. aegypti* seleccionadas, para tal efecto se utilizó índice de kappa (Cohen, 1960).

7. RESULTADOS

7.1 Frecuencia de las mutaciones V410L, V106I, F1534C en poblaciones de *Ae. aegypti*

En las tablas 2, 3 y 4 se muestran el número de mosquitos de cada genotipo, la frecuencia del alelo mutado y el intervalo de confianza al 95% de las poblaciones de *Ae. aegypti* del este y sur de México incluyendo una población de Belice.

La mutación V410L estuvo presente en todas las poblaciones de *Ae. aegypti* con frecuencias alélicas oscilando entre 0.12 para la población de Tampico a 0.98 para la población de Minatitlán. La mayoría de las poblaciones estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg de acuerdo al valor de X^2 de Pearson ya que los valores calculados fueron menores al valor tabulado de 3.48, a excepción de las poblaciones de Chiapas, del estado de Chiapas, Villahermosa de Tabasco y Vergel de Mérida (Tabla 2).

La mutación V1016I, estuvo presente en todas las poblaciones de *Ae. aegypti* con frecuencias alélicas oscilando entre 0.19 para la población de Poza Rica del estado de Veracruz a 0.95. La mayoría de las poblaciones se encontró en equilibrio Hardy-Weinberg a excepción de las poblaciones de Guadalupe del estado de Nuevo León; Chiapas del estado de Chiapas; Emilio Carranza, Cosoleacaque, y Minatitlán del estado de Veracruz; Frontera del estado de Tabasco y Vergel del estado de Yucatán. (Tabla 3).

La mutación F1534C estuvo presente al igual que las otras mutaciones en todas las poblaciones analizadas, con altas frecuencias y se encontró fija en las poblaciones de Monterrey del estado de Nuevo León; San Antonio Kaua del estado de Yucatán, Cd. del Carmen de Campeche; Cardel, Emilio Carranza y Poza Rica de Veracruz; Felipe Carrillo de Quintana Roo; Villahermosa de Tabasco, Tampico de Tamaulipas y la población de Belice.

Tabla 2. Frecuencias alélicas y genotípicas de la mutación V410L en poblaciones de *Ae. aegypti* del este y sur de México.

Población	n	LL	VL	VV	Freq. (95% CI)	x2 Hardy-Weinberg	P value
Guadalupe	30	5	13	12	0.38 (0.23-0.56)	0.2088	0.6477
Chiapas	30	4	23	3	0.52 (0.36-0.68)	8.5880	0.0034
Monterrey	30	12	11	7	0.58 (0.40-0.73)	1.8113	0.1784
San Antonio Kaua	30	15	10	5	0.67 (0.83-1.01)	1.8750	0.1709
Campeche	30	9	14	7	0.53 (0.36-0.69)	0.1172	0.7321
Champotón	30	6	13	11	0.42 (0.26-0.59)	0.3536	0.5521
Cd. del Carmen	30	22	8	0	0.87 (0.69-0.95)	0.7101	0.3994
Cardel	30	27	3	0	0.95 (0.79-0.99)	0.0831	0.7731
E. Carranza	27	10	11	6	0.57 (0.38-0.73)	0.7521	0.3858
Poza Rica	29	19	7	3	0.78 (0.59-0.89)	2.7151	0.0994
Cosoleacaque	27	4	13	10	0.39 (0.23-0.57)	0.0046	0.9462
Minatitlán	30	29	1	0	0.98 (0.83-1.01)	0.0086	0.9260
Cancún	29	4	13	12	0.36 (0.21-0.54)	0.0254	0.8733
F. Carrillo	30	15	13	2	0.72 (0.53-0.84)	0.1348	0.7135
Umán	30	12	13	5	0.62 (0.43-0.76)	0.2088	0.6477
Coatzacoalcos	30	13	10	7	0.60 (0.42-0.75)	2.8009	0.0942
Acayucan	30	5	12	13	0.37 (0.21-0.54)	0.5776	0.4473
Frontera	30	4	14	12	0.37 (0.21-0.54)	0.0007	0.9791
H Cárdenas	30	24	5	1	0.88 (0.71-0.96)	1.0987	0.2945
Villahermosa	30	15	4	1	0.73 (0.85-0.55)	4.7290	0.0297
Tampico	29	1	5	23	0.12 (0.03-0.29)	1.0214	0.3122
Chetumal	25	7	12	6	0.52 (0.33-0.69)	0.0370	0.8475
Mérida	30	8	19	3	0.58 (0.40-0.73)	2.7517	0.0972
Vergel	30	10	19	1	0.65 (0.47-0.79)	4.6085	0.0318
Valladolid	30	12	15	3	0.65 (0.47-0.79)	0.2934	0.5880
Belice	30	5	18	7	0.47 (0.30-0.63)	1.2651	0.2607

n: tamaño de muestra

LL: mutado (resistente), VL heterocigoto, VV silvestre (susceptible)

Tabla 3. Frecuencias alélicas y genotípicas de las mutación V1016I en poblaciones de *Ae. aegypti* del este y sur de México.

Población	n	II	VI	VV	Freq. (95% CI)	χ^2 Hardy-Weinberg	P value
Guadalupe	30	10	20	0	0.67 (0.48-0.80)	7.5000	0.0062
Chiapas	30	3	26	1	0.53 (0.36-0.69)	16.4756	0.0000
Monterrey	30	5	17	8	0.45 (0.28-0.62)	0.6288	0.4278
San Antonio Kaua	30	16	12	2	0.73 (0.83-1.01)	0.0155	0.9009
Campeche	30	12	15	3	0.65 (0.47-0.79)	0.2934	0.5880
Champutón	30	5	14	11	0.40 (0.24-0.57)	0.0231	0.8791
Cd. del Carmen	30	22	6	2	0.83 (0.65-0.93)	2.3520	0.1251
Cardel	30	27	3	0	0.95 (0.79-0.99)	0.0831	0.7731
E. Carranza	27	0	20	7	0.37 (0.21-0.55)	9.3426	0.0022
Poza Rica	29	2	7	20	0.19 (0.08-0.37)	1.3368	0.2476
Cosoleacaque	27	6	20	1	0.59 (0.40-0.75)	7.7018	0.0055
Minatitlán	30	27	2	1	0.93 (0.77-0.99)	6.4668	0.0110
Cancún	29	17	12	0	0.79 (0.61-0.90)	1.9735	0.1601
F. Carrillo	30	15	13	2	0.72 (0.53-0.80)	0.1348	0.7135
Umán	30	9	17	4	0.58 (0.40-0.73)	0.8238	0.3641
Coatzacoalcos	30	10	18	2	0.63(0.45-0.78)	2.5556	0.1099
Acayucan	30	6	13	11	0.42 (0.26-0.59)	0.3536	0.5521
Frontera	30	5	25	0	0.58 (0.40-0.73)	15.3061	0.0001
H Cárdenas	30	24	5	1	0.88 (0.71-0.96)	1.0987	0.2945
Villahermosa	30	14	15	1	0.72 (0.53-0.84)	1.6035	0.2054
Tampico	29	15	10	4	0.69 (0.50-0.82)	1.0965	0.2950
Chetumal	25	6	13	6	0.50 (0.31-0.68)	2.2729	0.1317
Mérida	30	9	18	3	0.60 (0.42-0.75)	1.8750	0.1709
Vergel	30	9	20	1	0.63 (0.45-0.78)	5.6874	0.0171
Valladolid	30	12	15	3	0.65 (0.47-0.79)	0.2934	0.5880
Belice	30	24	5	1	0.88 (0.71-0.96)	1.0987	0.2945

n: tamaño de muestra

II: mutado (resistente), VI heterocigoto, VV silvestre (susceptible)

Tabla 4. Frecuencias alélicas y genotípicas de la mutación F1534C en poblaciones de *Ae. aegypti* del este y sur de México.

Población	n	CC	CF	FF	Freq. (95% CI)	X ² Hardy-Weinberg	P value
Guadalupe	30	29	1	0	0.98(0.83-1.01)	0.0086	0.9260
Chiapas	30	24	6	0	0.90(0.73-0.97)	0.3704	0.5428
Monterrey	30	30	0	0	1.0(0.86-1.02)	-	-
San Antonio Kaua	30	30	0	0	1.0(0.83-1.01)	-	-
Campeche	30	28	2	0	0.97(0.81-1.01)	0.0357	0.8502
Champutón	30	29	1	0	0.98(0.83-1.01)	0.0086	0.9260
Cd. del Carmen	30	30	0	0	1.0(0.86-1.02)	-	-
Cardel	30	30	0	0	1.0(0.86-1.02)	-	-
E. Carranza	27	27	0	0	1.0(0.84-1.02)	-	-
Poza Rica	29	29	0	0	1.0(0.85-1.02)	-	-
Cosoleacaque	27	17	10	0	0.81(0.62-0.92)	1.3946	0.2376
Minatitlán	30	18	11	1	0.78(0.60-0.89)	0.1929	0.6605
Cancún	29	27	2	0	0.97(0.81-1.0)	0.1730	0.6775
F. Carrillo	30	30	0	0	1.0(0.86-1.029)	-	-
Umán	30	27	3	0	0.95(0.79-0.99)	0.0831	0.7731
Coatzacoalcos	30	28	2	0	0.95(0.76-1.00)	0.0357	0.8502
Acayucan	30	25	5	0	0.95 (0.76-1.00)	0.2479	0.6185
Frontera	30	29	1	0	0.91(0.75-0.98)	0.0086	0.9260
H Cárdenas	30	7	22	1	0.98 (0.83-1.01)	8.3565	0.0038
Villahermosa	30	30	0	0	0.60 (0.42-0.75)	-	-
Tampico	29	29	0	0	1.0 (0.85-1.02)	-	-
Chetumal	25	24	1	0	1.0 (0.86-1.02)	0.0104	0.9187
Mérida	30	25	4	1	0.98 (0.81-1.01)	2.0165	0.1556
Vergel	30	30	0	0	0.90 (0.73-0.97)	-	-
Valladolid	30	16	14	0	0.77 (0.58-0.88)	2.7788	0.0955
Belice	30	30	0	0	1.00 (0.86-1.02)	-	-

n: tamaño de muestra

CC: mutado (resistente), FC heterocigoto, FF silvestre (susceptible)

Tabla 5. Co-ocurrencia de genotipos para las mutaciones V410L, V1016I y F1534C en poblaciones de *Ae. aegypti* del este y sur de México.

Población	N	LL/II/CC	LL/VI/CC	LL/VV/CC	LL/VI/FC	VL/II/CC	VL/VI/CC	VV/II/CC	VV/VI/CC	VL/VI/FC	LL/VV/FF	VV/VI/FC	VV/VV/CC	VL/VV/CC	VL/VV/FC	VV/VV/FC	LL/II/FC	LL/II/FF	VL/II/FC	LL/VF/FC	VL/Vi/FF
Guadalupe	30	5	6	0	1	4	9	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mérida	30	9	0	0	0	1	16	0	1	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0
Chiapas	30	1	3	0	0	2	16	0	1	4	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Monterrey	30	2	6	4	0	2	9	1	2	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
San Antonio K.	30	15	0	0	0	1	9	0	3	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Campeche	30	7	1	1	0	4	10	1	2	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Champotón	30	3	1	2	0	0	11	2	1	1	0	0	8	1	0	0	0	0	0	0	0
Cd. Del Carmen	30	19	2	1	0	3	4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Cardel	30	26	1	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E. Carranza	27	0	5	5	0	0	9	0	6	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
Poza Rica	29	0	2	17	0	0	5	2	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0
Cosoleacaque	27	4	0	0	0	2	10	0	1	0	0	9	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Minatitlán	30	17	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0
Cancún	29	3	0	0	0	7	6	6	5	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
F. Carrillo	30	15	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Coatzacoalcos	30	5	7	0	0	2	7	3	2	0	0	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0
Umán	30	8	4	0	0	1	10	0	1	2	0	0	3	0	0	1	0	0	0	0	0
Acayucan	30	0	1	3	0	2	5	4	3	2	0	2	3	4	0	0	0	0	0	1	0
Frontera	30	4	0	0	0	1	12	1	10	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H Cárdenas	30	7	0	0	2	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	1	15	1	1	0	0
Villahermosa	30	15	0	0	0	0	14	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Tampico	29	7	1	0	0	4	1	4	8	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Chetumal	25	6	1	0	0	0	11	0	0	0	0	0	5	0	0	2	0	0	0	0	0
Mérida 18	30	7	0	0	0	1	15	0	0	2	0	0	2	0	0	1	1	0	0	0	1
Vergel	30	9	1	0	0	0	19	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Valladolid	30	6	0	0	0	0	8	0	0	7	0	0	2	0	0	1	6	0	0	0	0
Belice	30	4	0	0	0	13	5	7	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

En la tabla 5 se muestran 20 combinaciones de genotipos de 27 probables, siendo el más frecuente el homocigoto resistente para 1534 y heterocigoto para 410 y 1016 (CC/VL/VI), seguido del genotipo resistente para las tres mutaciones (CC/LL/II). Los genotipos menos frecuentes fueron susceptible para 1534 y 410 en combinación con resistente para 410 (FF/VV/LL), el heterocigoto para 1534, susceptible para 1016 y heterocigoto para 410 (FC/VV/VL) y por último el heterocigoto para 1534 y susceptible para 1016 y 410 (FC/VV/VV).

7.2 Resistencia a piretroides

La tabla 6 se muestra los resultados de los bioensayos al someter los mosquitos a la dosis diagnóstico de 3 diferentes insecticidas piretroides; permetrina, deltametrina y transflutrina. Las figura 4 muestran la categorización de resistencia para las poblaciones analizadas de acuerdo a su distribución geográfica. El color rojo indica que la población resultó resistente al insecticida, el amarillo nivel confirmatorio y el azul representa susceptibilidad.

Tabla 6. Mortalidad de hembras de *Aedes aegypti* después de la exposición a dosis diagnóstico de insecticidas piretroides y estatus en el nivel de resistencia.

Población	% de Mortalidad					
	Permetrina	Status	Deltametrina	Status	Transflutrina	Status
Cardel	7	R ¹	80	R	93	C
Emilio Carranza	93	C ²	74	R	75	R
Cosoleacaque	0	R	75	R	71	R
Coatzacoalcos	91	C	99	S ³	99	S
Cancún	65	R	99	S	45	R
Vergel	87	R	86	R	73	R
Poza Rica	31	R	76	R	93	C
Minatitlán	75	R	80	R	78	R
Villahermosa	3	R	58	R	100	S
Mérida	85	R	76	R	97	C

¹R resistente, ²C resistencia por confirmar, ³S susceptible



Figura 4. Prevalencia de resistencia de poblaciones de *Ae. aegypti* a : a) Permetrina, b) Deltametrina y c) Transflutrina. EL color rojo indica resistencia, el amarillo resistente por confirmar y el azul susceptible.

El nivel de resistencia exhibido por las poblaciones de *Ae. aegypti* (tabla 2) fue mayor para el insecticida permetrina, ya que de las diez poblaciones analizadas ocho presentaron valores de mortalidad al exponerse a la DD de permetrina entre 0 a 93%. Las poblaciones de Emilio Carranza y Coatzacoalcos, ambas del estado de Veracruz presentaron valores de 91% y 93%, respectivamente, que caen en la línea de resistencia pero que debe ser confirmada ya sea con ensayos confirmatorios o análisis de enzimas o mutaciones en el sitio blanco de acción del insecticida (WHO 2016). Para la deltametrina, las poblaciones de Coatzacoalcos y Cancún resultaron susceptibles al exponer a la dosis diagnóstico, el resto de las poblaciones exhibieron resistencia a este insecticida. En el caso de la transflutrina las poblaciones de Coatzacoalcos y Villahermosa exhibieron susceptibilidad, Cardel, Poza Rica y Mérida quedaron en el nivel confirmatorio y el resto de las poblaciones resultaron resistentes a este piretroide. Cabe recalcar que para deltametrina y transflutrina la población de Coatzacoalcos coincidentemente resultó susceptible y en el nivel confirmatorio para permetrina.

7.3 Asociación fenotipo-genotipo

Un total de 10 poblaciones de *Ae. aegypti* expuestas a DD de los tres insecticidas piretroides fueron genotipadas y todas exhibieron las mutaciones V410L, V106I y F1534C. Los mosquitos de fenotipo vivo para cada insecticida en cada población se asociaron con el genotipo resistente homocigoto con respecto al homocigoto susceptible para cada mutación. La frecuencia del genotipo L410/L410 resistente estuvo significativamente asociado con la resistencia a deltametrina en la población de Cosoleacaque (OR= 0.0445, P = 0.0445) y Mérida (OR= 0.0159; P= 0.0002) y con transflutrina para las poblaciones de Cancún (OR= 10.833; P= 0.0257) y Vergel (OR= 0.0779; P= 0.01218). Sin embargo, no se encontró asociación de los genotipos resistentes para I1016/I1016 ni C1534/C1534.

Al analizar la asociación entre el genotipo resistente para cada mutación con respecto a los genotipos susceptible y heterocigoto en conjunto se encontró asociación significativa del genotipo resistente L410/L410 con la resistencia a la permetrina en las poblaciones de Coatzacoalcos y Vergel (ORs= 7 y 13.33; P< 0.05); para deltametrina en las poblaciones de Poza Rica, Cosoleacaque, Villahermosa, Mérida y Vergel (Ors= 4.37, 2.53, 7.09, 0.06 y 22, respectivamente; P< 0.05); y para transflutrina en las poblaciones de

Emilio Carranza, Minatitlán y Cancún (ORs = 5.84, 24 y 8.02, respectivamente; $P < 0.05$) (Tabla 7).

Para el caso de la mutación V1016I, el genotipo resistente I1016/I1016 se asoció significativamente con la resistencia a la permetrina en las poblaciones de Coatzacoalcos, Cancún, Mérida y Vergel (Ors = 7, 3.5, 3.15 y 24, respectivamente; $P < 0.05$). También se encontró asociación significativa con la resistencia a la deltametrina en las poblaciones de Cosoleacaque, Mérida y Vergel (Ors = 4.1, 5.90 y 22, respectivamente; $P < 0.05$). En el caso de la resistencia a la transflutrina sólo se encontró asociación positiva en las poblaciones de Emilio Carranza y Cancún (Ors = 5.8, 25.5, respectivamente; $P < 0.05$) (Tabla 8).

Para la mutación F1534C los resultados de OR fueron infinitos debido a la ausencia de haplotipos F1534/F1534 y F1534/C1534. Prácticamente esta mutación se encontró fija en todas las poblaciones analizadas (Tabla 9).

Tabla 7. Número de individuos por categoría (vivo-muerto) y número de individuos por genotipo para el loci 410 de poblaciones de *Ae. aegypti*.

Insecticida	Población	Número de individuos	Fenotipo	Genotipo			OR	P
				LL	LV	VV		
Permetrina				LL	LV	VV		
	Cardel	30	Vivo	30	0	0	-	-
		7	Muerto	6	1	0		
	Emilio Carranza	7	Vivo	7	0	0	-	-
		30	Muerto	24	5	1		
	Poza Rica	30	Vivo	30	0	0	-	-
		30	Muerto	30	0	0		
	Cosoleacaque	30	Vivo	12	10	8	-	-
		0	Muerto	0	0	0		
	Minatitlán	25	Vivo	11	10	4	1.1131	0.53210
		29	Muerto	12	16	1		
	Coatzacoalcos	9	Vivo	3	6	0	7	0.07024
		30	Muerto	2	8	20		
	Villahermosa	30	Vivo	21	9	0	-	-
		3	Muerto	0	1	2		
	Cancún	30	Vivo	0	9	21	-	-
		15	Muerto	5	8	2		

	Mérida	11	Vivo	2	7	2	-	-
		29	Muerto	0	09	20		
	Vergel	13	Vivo	10	3	0		
		30	Muerto	6	23	1		
Deltametrina	Cardel	20	Vivo	20	0	0	-	-
		30	Muerto	28	2	0		
	Emilio Carranza	26	Vivo	25	1	0	58.3333	1.76347
		30	Muerto	9	17	4		
	Poza Rica	18	Vivo	15	3	0	4.375	0.03419
		30	Muerto	16	8	6		
	Cosoleacaque	25	Vivo	12	11	2	2.5385	0.08751
		30	Muerto	8	14	8		
	Minatitlán	15	Vivo	13	2	0	2.3214	0.31197
		19	Muerto	14	5	0		
	Coatzacoalcos	1	Vivo	1	0	0	-	-
		23	Muerto	2	9	12		
	Villahermosa	21	Vivo	18	3	0	7.0909	0.00581
		24	Muerto	11	13	0		
	Cancún	1	Vivo	0	1	0	-	-
		30	Muerto	17	10	3		
	Mérida	24	Vivo	2	15	7	0.0606	0.00007
		30	Muerto	18	11	1		
	Vergel	14	Vivo	12	2	0	22	0.00091
		14	Muerto	3	10	1		
Transflutrina	Cardel	7	Vivo	7	0	0	-	-
		29	Muerto	25	4	0		
	Emilio Carranza	25	Vivo	17	8	0	5.8438	0.00240
		30	Muerto	8	15	7		
	Poza Rica	25	Vivo	25	0	0	-	-
		30	Muerto	13	17	0		
	Cosoleacaque	27	Vivo	17	10	0	49.3	8.30661
		30	Muerto	1	23	6		
	Minatitlán	22	Vivo	21	1	0	24	0.00015
		30	Muerto	14	14	2		
	Coatzacoalcos	0	Vivo	0	0	0	-	-
		30	Muerto	6	10	14		
	Villahermosa	0	Vivo	0	0	0	-	-
		30	Muerto	19	11	0		
	Cancún	30	Vivo	13	14	3	8.0294	0.00540
		23	Muerto	2	16	5		
	Mérida	3	Vivo	3	0	0	-	-
		30	Muerto	10	18	2		
	Vergel	25	Vivo	3	11	11	0.4091	0.19701
		28	Muerto	7	19	2		

LL resistente, VL heterocigoto, VV silvestre

Tabla 8. Número de individuos por categoría (vivo-muerto) y número de individuos por genotipo para el loci 1016 de poblaciones de *Ae. aegypti*.

Insecticida	Población	Número de individuos	Fenotipo	Genotipo			OR	P
Permetrina				II	VI	VV		
	Cardel	30	Vivo	20	9	1	-	-
		7	Muerto	7	0	0		
	Emilio Carranza	7	Vivo	7	0	0	-	-
		30	Muerto	5	23	2		
	Poza Rica	30	Vivo	21	9	9	-	-
		30	Muerto	30	0	0		
	Cosoleacaque	30	Vivo	11	11	8	-	-
		0	Muerto	0	0	0		
	Minatitlán	25	Vivo	5	20	0	0.475	0.18991
		29	Muerto	10	18	1		
	Coatzacoalcos	9	Vivo	3	6	0	7	0.07024
		30	Muerto	2	8	20		
	Villahermosa	30	Vivo	19	11	0	3.4545	0.33834
		3	Muerto	1	2	0		
	Cancún	30	Vivo	24	6	0	3.5	0.06695
		15	Muerto	8	7	0		
	Mérida	11	Vivo	6	5	0	3.15	0.11131
		29	Muerto	8	16	5		
	Vergel	13	Vivo	12	0	1	24	0.00038
		30	Muerto	10	18	2		
Deltametrina	Cardel	20	Vivo	20	0	0	-	-
		30	Muerto	30	0	0		
	Emilio Carranza	26	Vivo	24	2	0	0.8571	0.63798
		30	Muerto	28	2	0		
	Poza Rica	18	Vivo	18	0	0	-	-
		30	Muerto	17	7	6		
	Cosoleacaque	25	Vivo	15	10	0	4.125	0.01286
		30	Muerto	8	14	8		
	Minatitlán	15	Vivo	15	0	0	-	-
		19	Muerto	8	11	0		
	Coatzacoalcos	1	Vivo	1	0	0	-	-
		23	Muerto	1	7	15		
	Villahermosa	21	Vivo	18	3	0	132	2.18620
		24	Muerto	1	7	15		
	Cancún	1	Vivo	1	0	0	-	-
		30	Muerto	25	5	0		
	Mérida	24	Vivo	13	11	0		

		30	Muerto	5	25	0	5.9091	0.00428
	Vergel	14	Vivo	12	2	0	22	0.00091
		14	Muerto	3	9	2		
Transflutrina	Cardel	7	Vivo	7	0	0	-	-
		29	Muerto	26	3	0		
	Emilio Carranza	25	Vivo	17	8	0	5.8438	0.00240
		30	Muerto	8	15	7		
	Poza Rica	25	Vivo	25	0	0	-	-
		30	Muerto	13	17	0		
	Cosoleacaque	27	Vivo	27	0	0	-	-
		30	Muerto	1	22	7		
	Minatitlán	22	Vivo	22	0	0	-	-
		30	Muerto	14	14	2		
	Coatzacoalcos	0	Vivo	0	0	0	-	-
		30	Muerto	0	17	13		
	Villahermosa	0	Vivo	0	0	0	-	-
		30	Muerto	17	13	0		
	Cancún	30	Vivo	27	3	0	25.5	<0.00001
		23	Muerto	6	17	0		
	Mérida	3	Vivo	2	1	0	3.4545	0.33834
		30	Muerto	11	19	0		
	Vergel	25	Vivo	25	0	0	-	-
		28	Muerto	18	8	2		

II resistente, VI heterocigoto, VV silvestre

Tabla 9. Asociación de genotipo resistente para F1534C con la resistencia a piretroides

Insecticida	Población	Número de individuos	Fenotipo	Genotipo			OR	P
Permetrina				CC	FC	FF		
	Cardel	30	Vivo	30	0	0	-	-
		7	Muerto	6	1	0		
	Emilio Carranza	7	Vivo	7	0	0	-	-
		30	Muerto	30	0	0		
	Poza Rica	30	Vivo	30	0	0	-	-
		30	Muerto	25	5	0		
	Cosoleacaque	30	Vivo	30	0	0	-	-
		0	Muerto	0	0	0		
	Minatitlán	25	Vivo	25	0	0	-	-
		29	Muerto	29	0	0		
	Coatzacoalcos	9	Vivo	3	6	0	2	0.33807
		30	Muerto	6	24	0		
	Villahermosa	30	Vivo	30	0	0		

		3	Muerto	3	0	0	-	-
	Cancún	30	Vivo	30	0	0	-	-
		15	Muerto	14	1	0		
	Mérida	11	Vivo	11	0	0	-	-
		29	Muerto	29	0	0		
	Vergel	13	Vivo	0	13	0	-	-
		30	Muerto	30	0	0		
Deltametrina	Cardel	20	Vivo	20	0	0	-	-
		30	Muerto	30	0	0		
	Emilio Carranza	26	Vivo	25	0	1	-	-
		30	Muerto	30	0	0		
	Poza Rica	18	Vivo	18	0	0	-	-
		30	Muerto	26	4	0		
	Cosoleacaque	25	Vivo	25	0	0	-	-
		30	Muerto	30	0	0		
	Minatitlán	15	Vivo	15	0	0	-	-
		19	Muerto	18	1	0		
	Coatzacoalcos	1	Vivo	1	0	0	-	-
		23	Muerto	10	12	1		
	Villahermosa	21	Vivo	21	0	0	-	-
		24	Muerto	10	12	1		
	Cancún	1	Vivo	1	0	0	-	-
		30	Muerto	30	0	0		
	Mérida	24	Vivo	24	0	0	-	-
		30	Muerto	19	11	0		
	Vergel	14	Vivo	14	0	0	-	-
		14	Muerto	14	0	0		
Transflutrina	Cardel	7	Vivo	7	0	0	-	-
		29	Muerto	29	0	0		
	Emilio Carranza	25	Vivo	25	0	0	-	-
		30	Muerto	29	1	0		
	Poza Rica	25	Vivo	25	0	0	-	-
		30	Muerto	30	0	0		
	Cosoleacaque	27	Vivo	27	0	0	-	-
		30	Muerto	30	0	0		
	Minatitlán	22	Vivo	22	0	0	-	-
		30	Muerto	30	0	0		
	Coatzacoalcos	0	Vivo	0	0	0	-	-
		30	Muerto	22	7	1		
	Villahermosa	0	Vivo	0	0	0	-	-
		30	Muerto	30	0	0		
	Cancún	30	Vivo	30	0	0	-	-
		23	Muerto	23	0	0		
	Mérida	3	Vivo	3	0	0	-	-
		30	Muerto	30	0	0		

	Vergel	25	Vivo	25	0	0	-	-
		28	Muerto	30	0	0		

CC resistente, FC heterocigoto, FF silvestre

7.4 Estandarización de la PCR Multiplex

Las pruebas para la optimización de las condiciones de PCR resultaron en el siguiente protocolo de PCR multiplex.

Las muestras de ADN usadas en el proceso de amplificación estuvieron en un rango de concentraciones de 20-250 ng/μL. El volumen final de reacción fue de 19.12 μL de la mezcla de reacción que contiene: Buffer 1.02X; MgCl₂ 1.53 mM; dNTP's 0.2 mM; los oligonucleótidos para genotipar 410 a una concentración de 1.27pmol/μL, para 1016 a una concentración de 1.02pmol/μL y para 1534 a una concentración final de reacción de 0.82pmol/μL (Tabla 1), y además 5 U de Taq DNA polimerasa.

La reacción fue llevada a cabo en un termociclador Multigene Optimax (Labnet International, Edison NJ, USA). Las condiciones de reacción fueron conducidas como sigue: 95°C por 2 min para la separación inicial de las cadenas de DNA, seguida por 45 ciclos de 95°C (30 seg), 58.6°C (1 min) y 72°C (30 seg) y una extensión final por 2 min. Un tubo de PCR que contenía todos los componentes excepto el DNA genómico fue corrido con los primers como control de contaminación. Los controles fueron incluidos en cada PCR que se realizó, se usó como control susceptible la población New Orleans y la población homocigota resistente IMU5 (Saavedra-Rodriguez et al. 2007).

Después de la amplificación se analizaron 4 μl de los productos de la reacción de PCR, mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 2.5%. Las condiciones de electroforesis fueron de 110V por 1 hora usando el buffer SB 1X (buffer ácido bórico-sodio, 200mM NaOH, pH8, y ácido bórico) y teñidos con gel red (GelRed® (Biotium, Hayward CA, USA) y un marcador de peso molecular de 25pb para verificar el tamaño de los fragmentos. Los productos de PCR se visualizaron en un transiluminador (UVITEC, Cambrigde, UK). Al final del proceso de amplificación es posible obtener hasta 7 productos

de PCR por muestra, cuyo tamaño indica la combinación genotípica para los loci 410, 1016, 1534 (Figura 5).

Al final del proceso de amplificación es posible obtener hasta 7 productos de PCR por muestra, cuyo tamaño indica la combinación genotípica para los loci 410, 1016, 1534 representados en la tabla 10.

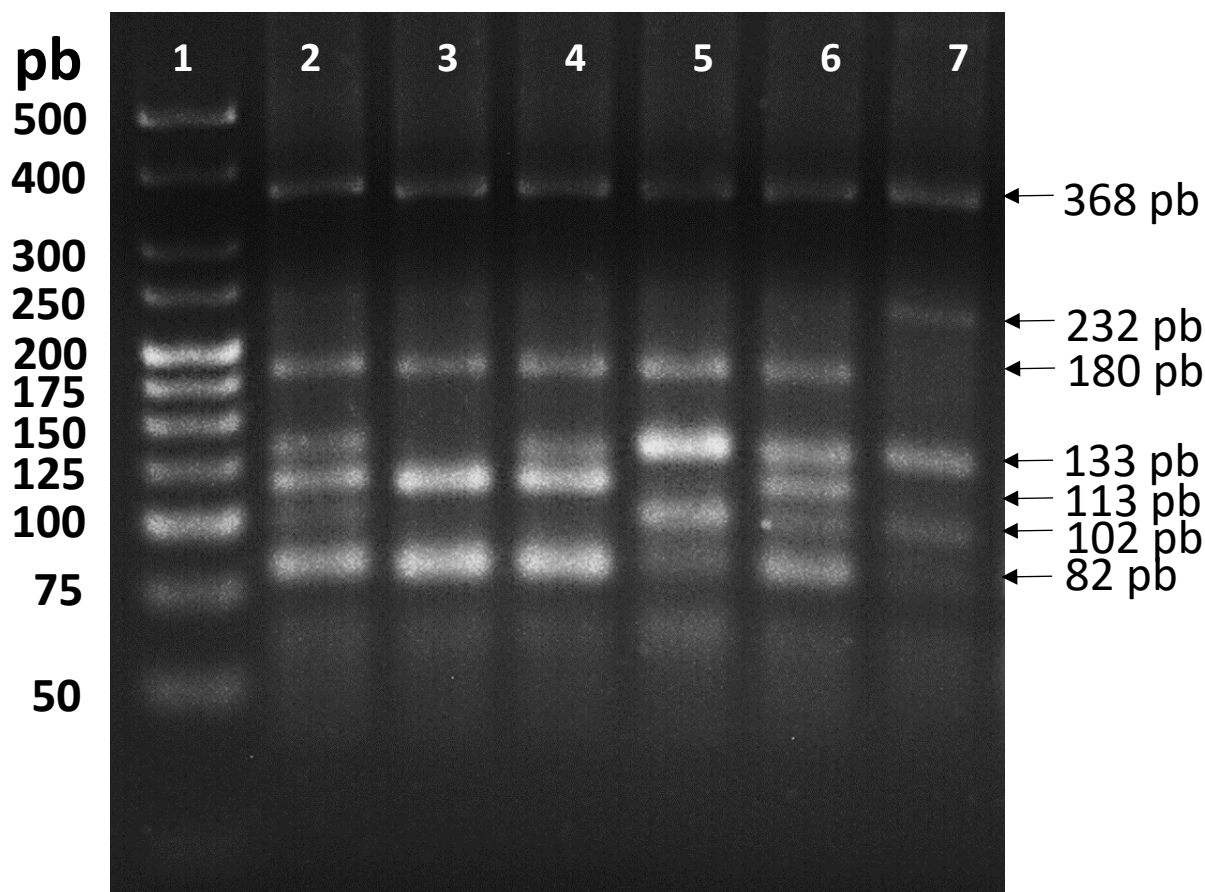
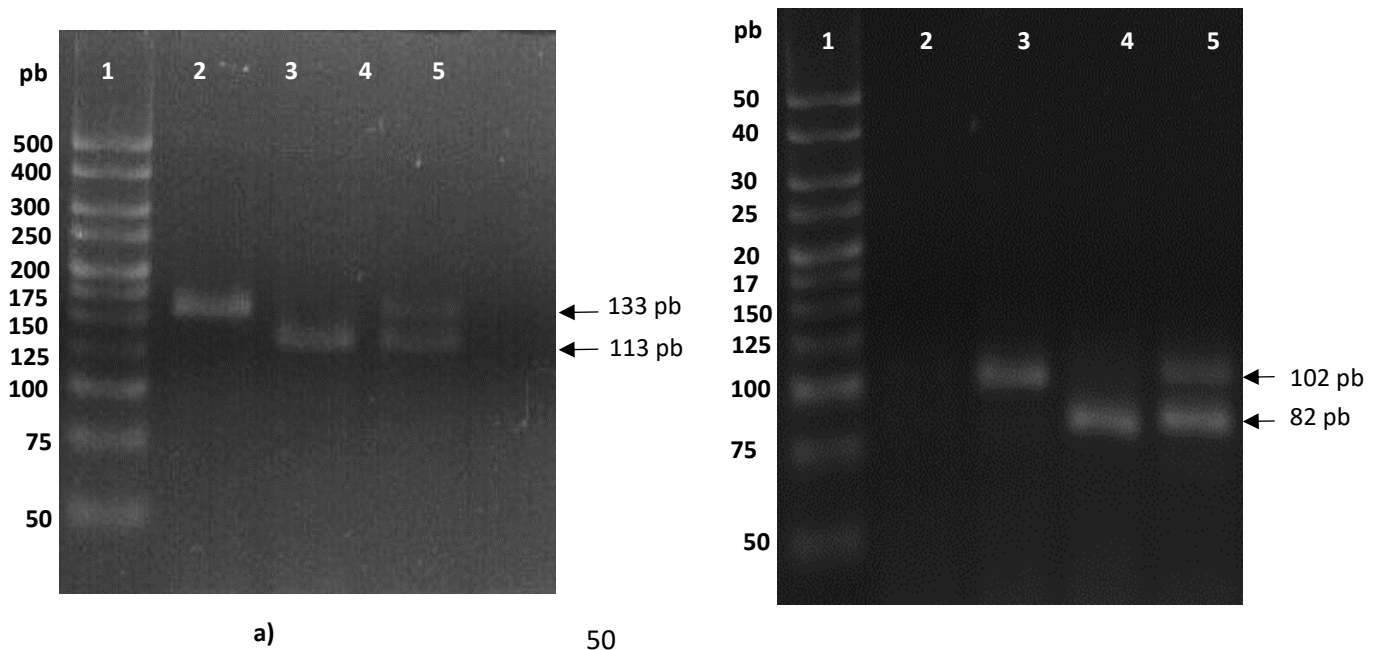


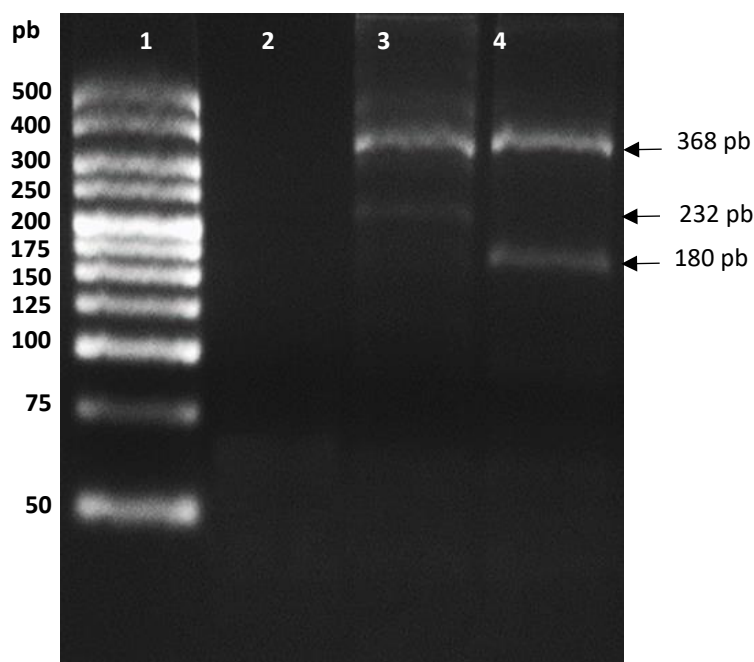
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% de productos amplificados de DNAg en varios mosquitos usando la PCR múltiple. Las flechas indican una banda común de 368 pb, una banda de 232 pb que corresponde al alelo susceptible F1534, una banda de 180 pb que corresponde al alelo resistente C1534, una banda de 133 pb que corresponde al alelo susceptible V410, una banda de 113 pb que corresponde al alelo resistente L410, una banda de 102 pb que corresponde al alelo V1016 susceptible, una banda de 82 pb que corresponde

al alelo I1016 resistente. Carril 1 muestra el marcador de peso molecular (25pb DNA ladder). Carril 2 corresponde a un individuo homocigoto resistente (C1534/C1534), heterocigoto (V410/L410) y heterocigoto (V1016/I1016). Carril 3 muestra un individuo homocigoto resistente (C1534/C1534), homocigoto resistente (L410/L410) y homocigoto resistente (I1016/I1016). Carril 4 corresponde a un individuo homocigoto resistente (C1534/C1534), heterocigoto (V410/L410) y homocigoto resistente (I1016/I1016). Carril 5 corresponde un individuo homocigoto resistente (C1534/C1534), homocigoto susceptible (V410/V410) y heterocigoto (V1016/I1016). Carril 6 corresponde a un individuo homocigoto resistente (C1534/C1534), heterocigoto (V410/L410) y heterocigoto (V1016/I1016). Carril 7 corresponde a un individuo triple homocigoto susceptible (V410/V410, V1016/V1016, F1534/F1534).

En la figura 6 se muestran los geles de agarosa para cada una de las mutaciones de manera individual.



b)



c)

Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% de productos de PCR de DNAg en mosquitos por reacción individual **(a)** Para la mutación V410L el carril 1 muestra el marcador peso molecular (25 pb DNA ladder), carril 2 una banda de 133 pb que corresponde al genotipo homocigoto susceptible (V410/V410), carril 3 una banda de 113 pb que corresponde al genotipo homocigoto resistente (L410/L410), carril 4 dos bandas, una de 133 pb y otra de 113 pb que corresponde al genotipo heterocigoto (V410/L410), carril 5 control negativo (agua) **(b)** Para la mutación V1016I el carril 1 muestra el marcador de peso molecular (25 pb DNA ladder), carril 2 control negativo (agua), carril 3 una banda de 102 pb que corresponde al genotipo homocigoto susceptible (V1016/V1016), carril 4 una banda de 82 pb que corresponde al genotipo homocigoto resistente (I1016/I1016), carril 5 dos bandas, una de 102 pb y otra de 82 pb que corresponde al genotipo heterocigoto (VI1016/I1016) **(c)** Para la mutación F1534C en todos los carriles se muestra una banda común de 368 pb, el carril 1 muestra el marcador de peso molecular (25 pb DNA ladder), carril 2 control negativo (agua), carril 3 una banda de 232 pb que corresponde al genotipo homocigoto susceptible (F1534/F1534), carril 4 una banda de 180 pb que corresponde al genotipo homocigoto resistente (C1534/C1534).

Tabla. 10. Combinación genotípica para los loci 410, 1016, 1534

	Genotipo	Tamaño en pb
1	homocigoto resistente 410/homocigoto resistente 1016/homocigoto resistente 1534	113, 82, 180
2	homocigoto resistente 410/homocigoto resistente 1016/heterocigoto 1534	113, 82, 180, 232
3	homocigoto resistente 410/homocigoto resistente 1016/homocigoto susceptible 1534	113, 82, 232
4	homocigoto resistente 410/heterocigoto 1016/homocigoto resistente 1534	113, 82, 102, 180
5	homocigoto resistente 410/heterocigoto 1016/heterocigoto 1534	113, 82, 102, 180, 232
6	homocigoto resistente 410/heterocigoto 1016/homocigoto susceptible 1534	113, 82, 102, 232
7	homocigoto resistente 410/homocigoto susceptible 1016/homocigoto resistente 1534	113, 102, 180
8	homocigoto resistente 410/homocigoto susceptible 1016/heterocigoto 1534	113, 102, 180, 232
9	homocigoto resistente 410/homocigoto susceptible 1016/homocigoto susceptible 1534	113, 102, 232
10	heterocigoto 410/homocigoto resistente 1016/homocigoto resistente 1534	113, 133, 82, 180
11	heterocigoto 410/homocigoto resistente 1016/heterocigoto 1534	113, 133, 82, 180, 232
12	heterocigoto 410/homocigoto resistente 1016/homocigoto susceptible 1534	113, 133, 82, 232
13	heterocigoto 410/heterocigoto 1016/homocigoto resistente 1534	113, 133, 82, 102, 180
14	heterocigoto 410/heterocigoto 1016/heterocigoto 1534	113, 133, 82, 102, 180, 232
15	heterocigoto 410/heterocigoto 1016/homocigoto susceptible 1534	113, 133, 82, 102, 232
16	heterocigoto 410/homocigoto susceptible 1016/homocigoto resistente 1534	113, 133, 102, 180
17	heterocigoto 410/homocigoto susceptible 1016/heterocigoto 1534	113, 133, 102, 180, 232
18	heterocigoto 410/homocigoto susceptible 1016/homocigoto susceptible 1534	113, 133, 102, 232
19	homocigoto susceptible 410/homocigoto resistente 1016/homocigoto resistente 1534	133, 82, 180
20	homocigoto susceptible 410/homocigoto resistente 1016/heterocigoto 1534	133, 82, 180, 232
21	homocigoto susceptible 410/homocigoto resistente 1016/homocigoto susceptible 1534	133, 82, 232
22	homocigoto susceptible 410/heterocigoto 1016/homocigoto resistente 1534	133, 82, 102, 180
23	homocigoto susceptible 410/heterocigoto 1016/heterocigoto 1534	133, 82, 102, 180, 232
24	homocigoto susceptible 410/heterocigoto 1016/homocigoto susceptible 1534	133, 82, 102, 232
25	homocigoto susceptible 410/homocigoto susceptible 1016/homocigoto resistente 1534	133, 102, 180
26	homocigoto susceptible 410/homocigoto susceptible 1016/heterocigoto 1534	133, 102, 180, 232
27	homocigoto susceptible 410/homocigoto susceptible 1016/homocigoto susceptible 1534	133, 102, 232

7.5 Validación de la PCR Multiplex

Se seleccionaron cinco poblaciones de *Ae. aegypti* para la validación de la PCR mutiplex, que fueron previamente genotipadas por AS-PCR para cada una de las mutaciones kdr y confirmada su resistencia a los insecticidas piretroides permetrina, deltametrina y transflutrina. En la tabla 11 se muestran los resultados de genotipado individual y el obtenido por PCR multiplex en las poblaciones de *Ae. aegypti* seleccionadas. Los resultados indican un 100% de correspondencia en las frecuencias alélicas para los tres loci, por lo que no fue necesario aplicar el estadístico kappa de Cohen.

Tabla 11. Frecuencias de las mutaciones L410, I1016, C1534 en poblaciones de *Ae. aegypti* de México determinadas por la técnica de PCR Multiplex en contraste con AS-PCR

Población	Multiplex PCR / AS-PCR												
	410					1016				1534			
	n	VV	VL	LL	Frecuencia.	VV	VI	II	Frecuencia	FF	FC	CC	Frecuencia
Mérida	30	3/3	18/18	9/9	0.60	3/3	17/17	10/10	0.62	0/0	0/0	30/30	1.0
San Antonio K.	30	5/5	10/10	15/15	0.67	2/2	12/12	16/16	0.73	0/0	0/0	30/30	1.0
Chiapas	29	2/2	21/21	6/6	0.57	1/2	25/25	3/3	0.53	0/0	6/6	23/23	0.90
Guadalupe	30	4/4	14/14	12/12	0.63	0/0	20/20	10/10	0.67	0/0	1/1	29/29	0.98
Monterrey	28	6/6	11/11	11/11	0.59	8/8	16/16	4/4	0.43	0/0	0/0	30/30	1.0

8. DISCUSIÓN

Se observaron altas frecuencias de las mutaciones V1016I y F1534C en poblaciones de *Ae. aegypti* como lo han reportado previamente Flores et al. en (2013), Aponte et al. (2013), López et al. 2014 y Saavedra et al. (2015). Con respecto a la mutación V410L se cuenta con dos registros de esta mutación en poblaciones de *Ae. aegypti* de México (Saavedra et al. 2018, Villanueva-Segura et al. 2019). El estudio de Villanueva-Segura et al. (2019) demostró que que esta mutación esta estuvo presente en las 27 poblaciones de *Ae. aegypti* colectadas en México durante el 2018, con altas frecuencias, además de que la mayoría de las poblaciones estuvieron en equilibrio de acuerdo con la Ley de Hardy-Weingberg. Las altas frecuencias de la mutación *kdr* V1016I se ve afectada por la fijación de la mutación F1534C que aumentan sus frecuencias concurrentemente (Vera-Maloof et al. 2015), estas altas frecuencias se ven seleccionadas debido al uso de piretroides en México por más de 10 años (Siller et al. 2011, Aponte et al. 2013).

Al analizar la resistencia a los insecticidas permetrina, deltametrina y transflutrina y la co-ocurrencia de las tres mutaciones en las poblaciones analizadas, la población de Cosoleacaque mostro alta resistencia para los tres insecticidas, el genotipo con mayor frecuencia fue CC/VI/VL que concuerda con lo reportado por Saavedra et al. (2018), indicando que la sola presencia del heterocigoto para 410 y 1016 son suficientes para conferir resistencia al derribo para deltametrina, en contraste se necesita el alelo mutado para el loci 1534 para conferir resistencia a la permetrina. Contrario a lo anterior, Sombié (2019), mostró que altas frecuencias del homocigoto resistente C1534/C1534 confieren resistencia a permetrina, concordando con el presente estudio donde se tuvo una supervivencia del 100% a este insecticida en los individuos con el alelo C1534. La población de Cosoleacaque

presentó un 33.3% de heterocigotos para 1534 y considerando lo que establece (Vera-Maloof et al. 2015), esta característica le confiere un menor “fitness-cost” con respecto al homocigoto resistente. En particular en esta población el genotipo más frecuente fue VV/VI/FC para las mutaciones 410, 1016 y 1534 respectivamente. Se presume que la presencia de la mutación I1016 no confiere resistencia a los insecticidas piretroides sin embargo se cree que proporciona un equilibrio al costo de otras como la C1534 (Chen et al. 2019), por lo que resulta en una mayor resistencia con menor “fitness-cost”, esto es, que se tiene la mayor resistencia a los insecticidas piretroides con un mejor rendimiento metabólico.

La importancia de los estudios retrospectivos y la vigilancia entomológica se muestra en lo obtenido por Ponce-García et al. (2009) quienes analizaron la frecuencia de la mutación V1016I en *Ae. aegypti* de México, ellos encontraron que entre 1997-1998 esta mutación no estaba presente a excepción de una población de *Ae. aegypti* de Nuevo Laredo, con la presencia de un individuo heterocigoto, para el año 2007 y 2008 la mutación ya se encontraba con frecuencias entre 0.5 a 0.7, en comparación con nuestro estudio donde estos oscilan entre los valores obtenidos en el presente estudio y llegando a tener una frecuencia de 0.19 en Poza Rica a 0.95 en la población de Cardel, ambas del estado de Veracruz. Las poblaciones que de nuestro estudio que coinciden con los rangos reportados por Ponce-García et al. (2009) son las poblaciones de Monterrey con una frecuencia de 0.45 y Minatitlán con 0.93.

Otros estudios demuestran que no todos los mecanismos primarios de variación en la susceptibilidad en artrópodos se deben a mutaciones kdr, pero pueden ser un potencial de selección para las mismas, como el caso de las poblaciones de Vergel y Mérida que tienen un porcentaje considerable de individuos vivos a la exposición a la DD de los tres insecticidas piretroides probados, sin presentar algún alelo mutado para los loci 1016 y 410; lo que sugiere

la presencia de otros mecanismos de resistencia probablemente relacionados con mecanismos de desintoxicación. Tal es el caso de Bolivia con triatomíneos (Marcet et al. 2019) y en el caso de Indonesia donde se tienen individuos de *Ae. aegypti* heterocigotos para 1534 y resistencia a la cipermetrina y que además sugieren la presencia de enzimas dependientes de Cyp450 (Mulyaningsih et al. 2018).

Se han realizado ensayos para la detección de las mutaciones V1016I y F1534C de manera individual (Saavedra et al., 2007; Yanola et al., 2011), y como PCR múltiplex con otras mutaciones como V1016G y F1534C (Saingamsook et al., 2017), T1520I y F1534C (Kushwah, et al., 2015). Se debe de cuidar la interacción de los primers y que estos no formen dímeros entre ellos o el peso de las bandas no quede a la misma altura. Se tiene que considerar que los oligonucleótidos amplifiquen los fragmentos deseados bajo las mismas condiciones de PCR (Edwards y Gibbs, 1994).

En la literatura se establece que la *Taq* polimerasa depende del magnesio, pues este último actúa como cofactor para llevar a cabo el alineamiento de los nucleótidos correctos (Lorenz, 2012; Markoulatos et al., 2002). Cuando no se visualizan los resultados esperados en un gel de agarosa, se recomienda aumentar la concentración del MgCl₂, pero se debe tener en cuenta que esto podría afectar la especificidad de la *Taq* polimerasa (Lorenz, 2012). Cuando hay mucho magnesio en el medio, este puede influir en el alineamiento de los oligonucleótidos en las posiciones incorrectas, sin embargo, cuando hay escasez del mismo, o concentraciones extremadamente altas, puede que la reacción no se lleve a cabo debido a inhibición (Rossen et al. 1992, Gelfand 1989).

La acción de la *Taq* polimerasa, como se mencionó, depende de la cantidad de MgCl₂. El cambio en este reactivo se realizó con la finalidad de obtener bandas más notorias, bajo el

principio de la habilidad limitada para sintetizar ADN a temperaturas más altas de 90°C de la *Taq* polimerasa (Gelfand, 1989). Durante la mayoría de los ensayos, el volumen de la enzima se mantuvo a 0.4 µl, y no fue que se ajustó el volumen a 1 µl y se apreció un cambio en la intensidad de las bandas. Se facilitó la interpretación de resultados con el cambio realizado. Se tomó la decisión de dejar la *Taq* polimerasa a esa concentración (1 unidad por reacción), pues cantidades excesivas de la misma podrían resultar en amplificaciones no deseadas y un incremento en ruido al interpretar las imágenes reveladas en el fotodocumentador (Henegariu et al. 1997).

Por último, cabe mencionar la relación estrecha del magnesio con los nucleótidos (dNTP). Este último reactivo no sufrió cambios en el protocolo establecido, sin embargo, es posible que los cambios en el MgCl₂ tuvieron un efecto positivo. Se reporta que las concentraciones de ambos deben ser proporcionales debido a que cierta cantidad de MgCl₂ se une a los dNTP, y queda otra cantidad libre para la *Taq* polimerasa (Elnifro et al. 2000, Markoulatos et al. 2002). Al incrementar la concentración de dNTP, se disminuye el magnesio disponible para la acción de la *Taq* polimerasa, y se puede inhibir la misma PCR (Henegariu et al. 1997). Por esto se recomienda emplear una proporción de cloruro de magnesio que pueda mantener a ambos reactivos, preferentemente entre 0.5 y 5mM (Lorenz 2012).

Realizar la PCR incluso hoy todavía requiere tiempo y esfuerzo; sin embargo, el objetivo de desarrollar un método de PCR multiplex es principalmente reducir estos factores al poder amplificar varios alelos en la misma reacción. Esto es difícil cuando es hora de estandarizar el método, donde cada par de cebadores incluidos aumenta la dificultad ya que no es

suficiente para igualar la T_m (temperatura de fusión) y AG (adenosina: guanidina) de estos, por lo que se necesita un esfuerzo adicional en su diseño (Álvarez-Fernández 2013).

La optimización de cada método de PCR multiplex tiene dificultades críticas. El diseño de los cebadores es clave para una PCR exitosa, y la presencia de más de un par aumenta la posibilidad de dímeros y también requiere el ajuste de los otros componentes de PCR (tampones, dNTP, MgCl₂ y ADN polimerasa Taq) (Hernández-Cortez et al.2013).

Una de las principales utilidades de la PCR multiplex es la detección simultánea de múltiples genes, como serogrupos de patógenos como *Salmonella*, *Escherichia coli* O157 y *Listeria monocytogenes* (Lavalett et al. 2009, Garrido et al. 2013), incluidos los multiplex alelo-específicos. PCR para la detección de multirresistencia en *Mycobacterium tuberculosis* (Bing-Shao et al. 2012). Sin embargo, la utilidad de la PCR multiplex no se limita a esto; Tan et al. (2012) realizaron uno de los primeros informes de detección de mutaciones kdr múltiples para un solo sitio L1014L / S mediante PCR múltiple para los alelos L / S (TTG / TCG), L / F (TTG / TTT) y L / L (TTG / TTG). Se han realizado ensayos para la detección de mutaciones V1016I y F1534C individualmente (Saavedra et al., 2007; Yanola et al., 2011), y como PCR multiplex con otras mutaciones como V1016G y F1534C (Saingamsook et al., 2017), T1520I y F1534C (Kushwah et al., 2015). La mutación V410L se detectó por primera vez en coincidencia con las mutaciones V1016I y F1534C en *Ae. aegypti* pero solo por PCR simplex (Fernando et al. 2018).

La utilidad de la PCR multiplex tampoco se limita solo a la detección de un único mecanismo de resistencia. Kazanidou et al. (2009) estandarizaron la detección de polimorfismos mediante la sustitución de cinco nucleótidos en el gen del canal de sodio y el

gen ace-1 ([kdr-w homocigoto], [kdr-e homocigoto], [kdr heterocigoto], ace-1r homocigoto, y sus híbridos [ace1s / ace-1r, kdrs / kdr-w]) en solo una de las muestras.

9. CONCLUSIONES

El protocolo estandarizado para la PCR multiplex punto final resultó ser altamente específico y sensible (100% de concordancia con AS-PCR) para la detección de manera simultánea de tres mutaciones kdr V410L, V1016I y F1534C del gen *para* del canal de sodio dependiente de voltaje del mosquito *Aedes aegypti* (L.), cuando éstas co-ocurren en poblaciones naturales. Este método de diagnóstico fue altamente eficiente para detectar 12 genotipos en cinco poblaciones de *Ae. aegypti* de México.

Nuestro método es el primero diseñado para el genotipado múltiple de las tres mutaciones kdr en *Ae. aegypti* en México, V410L, V1016I y F1534C.

LITERATURA CITADA

- Albert LA, ALpuche L, Aranda HE Badillo F, Bárcenas PC, Cheiack R, Loera GR, Pomares TG, Rendón von OJ, Viveros RA. 1990. Los plaguicidas, el ambiente y la salud. Centro de Ecodesarrollo; México. Pp 157-173.
- Alonso-Díaz, M A, Rodríguez-Vivas, R I, Fragoso-Sánchez, H, & Rosario-Cruz, R. 2006. Ixodicide resistance of the the *Boophilus microplus* tick to ixodicides. Archivos de medicina veterinaria, 38(2), 105-113. <https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2006000200003>.
- Álvarez-Fernández Rubén. 2013. Explanatory Chapter: PCR Primer Design. Methods in Enzymology, Volume 529. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00001-X>
- Amelia-yap, Z. H., Sofian-azirun, M., Chen, C. D., & Lau, K. W. (2019). V1016G Point Mutation : The Key Mutation in the Voltage-Gated Sodium Channel (Vgsc) Gene of Pyrethroid-Resistant *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) in Indonesia Molecular Biology / Genomics V1016G Point Mutation : The Key Mutation in the Voltage- Gated Sodium Channel (Vgsc) Gene of Pyrethroid- Resistant *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) in Indonesia, (June). <https://doi.org/10.1093/jme/tjz035>
- Aponte H, Penilla P, Dzul-Manzanilla F, Che-Mendoza A, Lopez A, Solis F, Manrique-Saide P, Ranson H, Lenhart A, McCall P, Rodriguez A. 2013. The pyrethroid resistance status

- and mechanisms in *Aedes aegypti* from the Guerrero state, Mexico. *Pestic Biochem Physiol* 107(2):226–234.
- Barrera, R. 2016. Recomendaciones para la vigilancia de *Aedes aegypti*. *Biomédica*, 3636, 454–462.
- Bloomquist JR and T.A. Miller 1986. Sodium channel neurotoxin as probes of the knockdown resistance mechanism. *Neurotoxicology* 7 (1): 217-23.
- Bloomquist J.R. 1999. Insecticides: Chemistries and Characteristics. E.B. Radcliff and W.D. Hutchison Editors. Radcliffe's IPM World Textbook, URL: <http://ipmworld.imn.edu> , University of Minnesota, St. Paul, MN.
- Brengues, C., N. J. Hawkes, F. Chandre, L. McCarroll, S. Duchon, P. Guillet, S. Manguin, J. C. Morgan, and J. Hemingway. 2003. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Medical and Veterinary Entomology* 17:87-94.
- Brown, A. W. A., and R. Pal. 1971. Insecticide resistance in arthropods. / A. W. A. Brown, R. Pal, 2nd ed. Geneva: World Health Organization. URL: <http://www.who.int/iris/handle/10665/41685>
- Bowman D, Randy Carl Lynn, Mark L , Eberhard, Jay R Georgi. 2004. *Parasitología Veterinaria de Georgi*, Elsevier España. Pp. 257-258
- Brogdon WG, Beach RF, Steward JT y Castanaza L. 1998. Microplate assay analysis of organophosphate and carbamate resistance distribution in Guatemalan *Anopheles albimanus*, *Bull. WHO* 66:339-346.

- Chadwick, P. R., J. F. Invest, and M. J. Bowron. 1977. An example of cross resistance to pyrethroids in DDT resistant *Aedes aegypti*. *Pesticide Science*:618-624.
- Chen, M., Du, Y., Wu, S., Nomura, Y., Zhu, G., Zhorov, B. S., & Dong, K. 2019. Molecular evidence of sequential evolution of DDT- and pyrethroid-resistant sodium channel in *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(6), e0007432. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007432>
- Dong K., Du Y, Rinkevich F, Nomura Y, Xu P, Wang L, Silver K, Zhorov BS. 2014. Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 50: 1-17.
- Edwards, M., Gibbs, R. (1994). Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *Genome Res*, 3(1): 65-75.
- Elnifro, E., Ashshi, A., Cooper, R., Klapper, P. 2000. Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4): 559-570
- Fernando, S. D., Hapugoda, M., Perera, R., Saavedra-Rodriguez, K., Black, W. C., 4th, & De Silva, N. K. 2018. First report of V1016G and S989P knockdown resistant (kdr) mutations in pyrethroid-resistant Sri Lankan *Aedes aegypti* mosquitoes. *Parasites & vectors*, 11(1), 526. doi:10.1186/s13071-018-3113-0
- García, G. P., Flores, A. E., Fernández-Salas, I., Saavedra-Rodríguez, K., Reyes-Solis, G., Lozano-Fuentes, S., ... & Domínguez-Galera, M. 2009. Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in Mexico. *PLoS neglected tropical diseases*, 3(10), e531. doi:10.1371/journal.pntd.0000531.

- Garrido A., María-José Chapela, Belén Román, Paula Fajardo, Juan M. Vieites, Ana G. Cabado. 2013. In-house validation of a multiplex real-time PCR method for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*; 164: 92–98.
- Gelfand, D. 1989. *Taq* ADN Polymerase. PCR Technology, H. A. Erlich (ed.) Pp. 17-22.
- Haddi, K., Tomé, H. V. V., Du, Y., Valbon, W. R., Nomura, Y., Martins, G. F., ... Oliveira, E. E. 2017. Detection of a new pyrethroid resistance mutation (V410L) in the sodium channel of *Aedes aegypti*: a potential challenge for mosquito control. *Scientific Reports*, 7(October 2016), 46549. <https://doi.org/10.1038/srep46549>
- Harris, A. F., Rajatileka, S., & Ranson, H. (2010). Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(2), 277–284. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0623>
- Hemingway, J., B. J. Beaty, M. Rowland, T. W. Scott, and B. L. Sharp. 2006. The Innovative Vector Control Consortium: Improved control of mosquito-borne diseases. *Parasitology Today* 22:308-312.
- Hemingway, J., Hawkes, N. J., McCarroll, L., & Ranson, H. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. In *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 34: 653–665.
- Hemingway, J., and H. Ranson. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology* 45:371-391.
- Henegariu, O., Heerema, N., Dlouhy, S., Vance, G., Vogt, P. (1997). Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *Biotechniques*, 23: 504-511.

- Hernández-Cortez Cecilia, Méndez-Tenorio Alfonso, Aguilera-Arreola Ma. Guadalupe and Castro-Escarpulli Graciela. 2013. Design and standardization of four multiplex polymerase chain reactions to detect bacteria that cause gastrointestinal diseases. *Afr. J. Microbiol. Res.* Vol. 7(21), pp. 2673-2681. DOI: 10.5897/AJMR2013.5452
- Id, C. L. C., Saavedra-rodriguez, K., Kubik, T. D., Id, A. L., Id, S. L., & Black, W. C. 2019. Vgsc-interacting proteins are genetically associated with pyrethroid resistance in *Aedes aegypti*, 1–20.
- Kazanidou Athina, Dimitra Nikou, Maria Grigoriou, John Vontas, and George Skavdis. 2009. Short Report: A Multiplex PCR Assay for Simultaneous Genotyping of *kdr* and *ace-1* Loci in *Anopheles gambiae*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 80(2), pp. 236–238.
- Kroeger A., Manncheno M., Alarcón J. & Pesse K. 2006. Insecticide-impregnated bed nets for malaria control: varying experiences from Ecuador, Colombia, and Peru concerning acceptability and effectiveness. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53: 313-323.
- Kushwah, R., Dykes, C., Kapoor, N., Adak, T., Singh O. (2015). Pyrethroid-resistance and presence of Two Knockdown Resistance (*kdr*) mutations, F1534C and a novel mutation T1520I, in Indian *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(1): e3332.
- Lavalett L., Miryan Margot Sánchez, Nélida Muñoz, Jaime Moreno, Nora Cardona-Castro. 2009. Desarrollo y validación de una reacción en cadena de la polimerasa múltiple para la identificación de los serogrupos B, C2, D y E de *Salmonella* entérica. *Biomédica*; 29: 244-52.

- Lopez-Monroy, Beatriz, Gutierrez-Rodriguez, Selene M., Villanueva-Segura, Olga Karina, Ponce-Garcia, Gustavo, Morales-Forcada, Franco, Alvarez, Leslie C. Flores, Adriana E. 2018 Frequency and intensity of pyrethroid resistance through the CDC bottle bioassay and their association with the frequency of kdr mutations in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Mexico. *Pest Management Science*... doi:10.1002/ps.4916
- Lorenz, T. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J Vis Exp*, 63: 3998
- Loughney K, R Kreber, B Ganetzky. 1989. Molecular analysis of the para locus, a sodium channel gene in *Drosophila*. *Cellular* 58(6):1143-54.
- Maestre-Serrano R., Fontecha-Pacheco B., Guerrero-Villanueva J., Acosta., Guerra, M., & Pareja-Loaiza, (2018). Resistencia knockdown a DDT y piretroides en *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*: especies de interés en salud pública. *Miembros Activos Invawet*, 307.
- Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M. S., Darriet, F., Berge, J. B., Devonshire, A. L., y Pauron, D. 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* ss. *Insect molecular biology*, 7(2), 179-184.
- L, M. P., Pablo, S., A, M. L., & V, V. C. (2019). “ Genetic structure and sodium channel gene mutation analysis related to pyrethroid insecticide toxicity in sylvatic Andean *Triatoma infestans* from Bolivia .”

- Markoulatos, P., Siafakas, N., Moncany, M. (2002). Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J Clin Lab Analysis*, 16(1): 47-51.
- McDonald, A. E., and R. J. Wood. 1979. Mechanism of DDT resistance in larvae of the mosquito *Aedes aegypti* L.: The effect of DDT selection. *Pesticide Science* 10:383-388
- Nelson, M. J. 1986. *Aedes aegypti*: Biología y ecología. Organización Panamericana de la Salud.
- Norma Oficial Mexicana 2003. NOM-032-SSA-2-2002 para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector (DOF 21 julio del 2003). Norma Oficial Mexicana, Ciudad de México
- O'Reilly, A. O., B. P. S. Khambay, M. S. Williamson, L. M. Field, B. A. Wallace, and T. G. E. Davies. 2006. Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. *Biochemical Journal* 396:255-263.
- Oliva, C. F., Damiens, D., & Benedict, M. Q. 2014. Male reproductive biology of *Aedes* mosquitoes. *Acta Tropica*, 132(1)
- OPS, 2018. Fiebre por Dengue en las Américas. Plataforma de información en salud de las américas. Disponible en <http://www.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-dengue/dengue-nacional/9-dengue-pais-ano.html?showall=&start=1>. Consultado el 2 de julio de 2018.
- Ponce, G., Cantú, P. C., Flores, A., Badii, M., Zapata, R., López, B., & Fernández, I. 2006. Modo de acción de los insecticidas. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 7(4).

- Ponce Garcia Gustavo, Adriana E. Flores, I. Fernandez-Salas, Karla Saavedra-Rodriguez, Saul Lozano-Fuentes, J. Guillermo Bond, M. Casas-Martínez, J. M. Ramsey, J. Garcia-Rejon, M. Dominguez-Galera, H. Ranson, J. Hemingway and Lars Eisen, and William C. Black IV. 2009. Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in Mexico. PLoS Negl Trop Dis 3(10): 10pp.
- Prasittisuk, C., and Busvine J. R. 1977. DDT-resistant mosquito strains with cross-resistance to pyrethroids. Pesticide Science 8:527-533.
- Rajatileka, S., Black IV, W. C., Saavedra-Rodriguez, K., Trongtokit, Y., Apiwathnasorn, C., McCall, P. J., y Ranson, H. 2008. Development and application of a simple colorimetric assay reveals widespread distribution of sodium channel mutations in Thai populations of *Aedes aegypti*. Acta Tropica, 108(1), 54-57.
- Rinkevich FD, Du Y, Dong K. 2013. Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. Pestic Biochem Physiol. 2013;106:93–100.
- Rodhain F, Rosen L 1997. Mosquito vectors and dengue virus–vector relationships. In: Gubler DJ, Kano G, eds. Dengue and dengue haemorrhagic fever. CAB International Wallingford, Oxon, UK:45–60.
- Rongsriyam, Y., and J. R. Busvine. 1975. Cross resistance in DDT resistant strains of various mosquitoes (Diptera: Culicidae). Bulletin of Entomological Research 65:459-471.
- Rossen L., Norskov, P., Holmstrom, K., Ramussen O. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and ADN-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*, 17: 37-45.

- Saingamsook, J., Saeung, A., Yanola, J., Lumjuan, N., Walton, C., Somboon, P. 2017: A multiplex PCR for detection of knockdown resistance mutations, V1016G and F1534C, in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*, 10(465): 1-9.
- Savage HM Fritz CL, Rutstein D, Yolwa A, Vorndam V, Gubler DJ. 1998. Epidemic of dengue-4 virus in Yap State, Federated States of Micronesia, and implication of *Aedes hensilli* as an epidemic vector. *Am J of Trop Med and Hyg.* 58:519–524.
- Saavedra-Rodriguez K, Urdaneta-Marquez L, Rajatileka S, Moulton M, Flores AE, Fernandez-Salas I, Bisset J, Rodriguez M, McCall PJ, Donnelly MJ, Ranson H, Hemingway J, Black IV WC. 2007. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* 16 (6):785-798.
- Saavedra-Rodriguez K, Beaty M, Denham S, Lozano-Fuentes S, Garcia-Rejon J, Reyes-Solis G, Machain-Williams C, Loroño-Pino MA, Beaty B, Eisen L, Black IV WC. 2013. Insecticide resistance selection drives genetic different mutation among *Aedes aegypti* from Yucatan. *J Trop Med Hyg* 89 (5): 447.
- Saavedra-Rodriguez K, Beaty M, Lozano-Fuentes S, Denham S, Garcia-Rejon J, Reyes-Solis G, Machain-Williams C, Loroño-Pino MA, Flores AE, Ponce G, Beaty B, Eisen L, Black IV WC. 2015. Local Evolution of Pyrethroid Resistance Offsets Gene Flow among *Aedes aegypti* Collections in Yucatan State, Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 92(1):201-209.
- Saavedra-Rodriguez K, Vera Maloof F, Campbell CL, Garcia-Rejon J, Lenhart A, Penilla P, Rodriguez A, Acero Sandoval A, Flores AE, Ponce G, Lozano S, Black IV WC. 2018.

- Parallel evolution of *vgsc* mutations at domains IS6, IIS6 and IIIS6 in pyrethroids resistant *Aedes aegypti* from Mexico. *Sci Rep* 8:6747.
- Siller Q K, Gustavo Ponce, Saul Lozano and Adriana E. Flores. 2011. Update On the Frequency of Ile1016 Mutation In Voltage- Gated Sodium Channel Gene of *Aedes aegypti* In Mexico. *J Am Mosq Cont Assoc* 27(4):357-362.
- Smith, Letícia B. Kasai, Shinji Scott, Jeffrey G.. 2016. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 133, 1-12.
- Soderlund, D.M. , J.R. Bloomquist, F. Wong, L.L. Payne and D.C.Knipple. 1989. Molecular Neurobiology: impactions for Insecticide Action and Resistance. *Pestic. Sci.* 26:359-374.
- Soderlund, D. M., and J. R. Bloomquist. 1990. Molecular mechanisms of insecticide resistance, p. 58–96. *In* R. T. Roush and B. E. Tabashnik (ed.), *Pesticide Resistance in Arthropods*. Chapman and Hall, New York, N.Y.
- Soderlund, D.M., And Knipple, D.C., 2003. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 33, 563-577.
- Sombié, A., Saiki, E., Yaméogo, F., Sakurai, T., Shirozu, T., Fukumoto, S., ... Badolo, A. 2019. High frequencies of F1534C and V1016I *kdr* mutations and association with pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Somgandé (Ouagadougou), Burkina Faso, 5, 4–11.

- Tan Wei L., Chun X. Li, Zhong M. Wang, Mei D. Liu, Yan D. Dong, Xiang Y. Feng, Zhi M. Wu, Xiao X. Guo, Dan Xing, Ying M. Zhang, Zhong C. Wang, and Tong Y. Zhao. 2012. First detection of multiple knockdown resistance (*kdr*)-like mutations in voltage-gated sodium channel using three new genotyping methods in *Anopheles sinensis* from Guangxi province, China. *J. Med. Entomol.*; 49(5): 1012-1020.
- Vera-Maloof FZ, Saavedra-Rodriguez K, Elizondo-Quiroga AE, Lozano-Fuentes S, Black WC, IV. 2015 Coevolution of the Ile1,016 and Cys1,534 Mutations in the Voltage Gated Sodium Channel Gene of *Aedes aegypti* in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis* 9(12): e0004263. doi:10.1371/journal.pntd.0004263
- Williamson M, Martinez-Torres D, Hick C and Devonshire. 1996. A, Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides. *Mol Gen Genet* 252:51–60
- Yanola, J., Somboon P., Walton, C., Nachaiwien, W., Somwang, P., Prapanthadara, L. 2011. High-throughput assays for detection of the F1534C mutation in the voltage gated sodium channel gene in permethrin-resistant *Aedes aegypti* and the distribution of this mutation throughout Thailand. *Tropical Medicine & International Health*, 16(4): 501-509.
- Zaim M., Aitio A. & Nakashima N. 2000. Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Medical and Veterinary Entomology*. 14: 1-5